

HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY

Publication number: JP2002543822 (T)

Publication date: 2002-12-24

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international: G01N33/53; A61K39/395; A61P11/00; A61P31/14; C07K16/10; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09; C12P21/08; G01N33/569; G01N33/577; G01N33/53; A61K39/395; A61P11/00; A61P31/00; C07K16/08; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09; C12P21/08; G01N33/569; G01N33/577; (IPC1-7): C12N15/09; A61K39/395; A61P11/00; A61P31/14; C07K16/10; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12P21/08; G01N33/53; G01N33/569; G01N33/577

- European: C07K16/10F; G01N33/569K

Application number: JP20000617922T 20000518

Priority number(s): US19990134702P 19990518; WO2000US13694 20000518

Also published as:

-  WO0069462 (A1)
-  EP1178829 (A1)
-  EP1178829 (A4)
-  AU5441000 (A)
-  AR030019 (A1)

Abstract not available for JP 2002543822 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 0069462 (A1)**

This invention relates to novel human monoclonal antibodies (mAbs) and to the genes encoding same. More specifically, this invention relates to human monoclonal antibodies specifically reactive with an epitope of the fusion (F) protein of Respiratory Syncytial Virus (RSV). Such antibodies are useful for the therapeutic and/or prophylactic treatment of RSV infection in human patients, particularly infants and young children.

.....
Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号
特表2002-543822
(P2002-543822A)

(43)公表日 平成14年12月24日 (2002.12.24)

(51)Int.Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

A 6 1 K 39/395

A 6 1 P 11/00

31/14

識別記号

Z N A

F I

A 6 1 K 39/395

チ-マコ-ト^{*} (参考)

M 4 B 0 2 4

S 4 B 0 6 4

A 6 1 P 11/00

31/14

4 B 0 6 5

4 C 0 8 5

C 0 7 K 16/10

4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 92 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願2000-617922(P2000-617922)

(86) (22)出願日

平成12年5月18日 (2000.5.18)

(85)翻訳文提出日

平成13年11月16日 (2001.11.16)

(86)国際出願番号

P C T / U S 0 0 / 1 3 6 9 4

(87)国際公開番号

W O 0 0 / 6 9 4 6 2

(87)国際公開日

平成12年11月23日 (2000.11.23)

(31)優先権主張番号

6 0 / 1 3 4, 7 0 2

(32)優先日

平成11年5月18日 (1999.5.18)

(33)優先権主張国

米国 (U S)

(71)出願人 スミスクライン・ビーチャム・コーポレーション

SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION

アメリカ合衆国ペンシルベニア州19406-0939、キング・オブ・ブルシア、スウェーデランド・ロード709番

(72)発明者 ミッチャエル・エス・グロス

アメリカ合衆国19087ペンシルベニア州ウエイン、ピュー・ロード667番

(74)代理人 弁理士 青山 葵 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトモノクローナル抗体

(57)【要約】

本発明は、新規なヒトモノクローナル抗体 (mAb) および該モノクローナル抗体をコードしている遺伝子に関する。より詳細には、本発明は、RSウイルス (RSV) の融合 (F) 蛋白質のエピトープと特異的に反応するヒトモノクローナル抗体に関する。かかる抗体は、ヒト患者、特に幼児および幼い小さい子供におけるRSV 感染の治療的および/または予防的処理に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 R SウイルスのF蛋白質エピトープと特異的に反応し、G λ - 1 AおよびG λ - 1 Bよりなる群から選択される該ウイルスによる感染を中和できるヒトモノクローナル抗体およびその機能的フラグメント。

【請求項2】 図3 配列番号2のL鎖アミノ酸配列および図4 配列番号4のH鎖アミノ酸配列を含む請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】 図11 配列番号1-6によってコードされるL鎖アミノ酸配列および図10A-10B 配列番号1-5のDNA配列によってコードされるH鎖アミノ酸配列を含む請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】 フラグメントがF_v、F_{a b}およびF_(a b')₂よりなる群から選択される請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項5】 (a) 請求項1～4のいずれか1項記載のヒトモノクローナル抗体、改変抗体およびCDRのいずれかをコードしている核酸配列；

(b) (a)におけるいずれかの配列に相補的な核酸；および

(c) ストリンジエントな条件下で請求項1～4のいずれか1項記載のCDRにハイブリダイズできる18以上のヌクレオチドの核酸配列
よりなる群から選択される単離核酸分子。

【請求項6】 図8A-8Fおよび9A-9E 配列番号1-3および1-4、
または図10A-10Bおよび1-1 配列番号1-5および1-6の配列を含む請求
項5記載の単離核酸分子。

【請求項7】 請求項5または6のいずれか1項記載の核酸配列を含む組換えプラスミド。

【請求項8】 請求項7記載のプラスミドを含む宿主細胞。

【請求項9】 請求項8記載の宿主細胞を適当な温度およびpH条件下で培
地中において培養し、そのように生産された抗体を回収することを特徴とするR
SVに特異的なヒト抗体の生産法。

【請求項10】 RSVを含有する疑いのある供給源を診断上有効量の請求
項1記載のモノクローナル抗体と接触させ、モノクローナル抗体が該供給源に結
合するか否かを決定することを特徴とするRSVの検出法。

【請求項11】 ヒトに免疫治療上有効量の請求項1記載のモノクローナル抗体を投与することを特徴とする、ヒトにおけるRSV疾患に受動免疫治療を提供する方法。

【請求項12】 受動免疫治療が予防的に提供される請求項11記載の方法。

【請求項13】 医薬上許容される担体中における免疫治療上有効量の請求項1記載のモノクローナル抗体の少なくとも1投与量を含んでなる医薬組成物。

【請求項14】 免疫治療上有効量の請求項1記載のモノクローナル抗体の少なくとも1投与量を少なくとも1つの付加的なモノクローナル抗体と組み合わせて含んでなる医薬組成物。

【請求項15】 付加的なモノクローナル抗体がRSV F蛋白質抗原の異なるエピトープと反応性であることによって請求項1記載の抗体と区別される抗-RSV抗体である請求項14記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、新規なヒトモノクローナル抗体 (mAb) および該モノクローナル抗体をコードしている遺伝子に関する。より詳細には、本発明は、RSウイルス (Respiratory Syncytial Virus) (RSV) の融合 (F) 蛋白質のエピトープと特異的に反応するヒトモノクローナル抗体に関する。かかる抗体は、ヒト患者、特に幼児および幼い子供におけるRSV感染の治療的および/または予防的処理に有用である。

【0002】

(背景技術)

RSウイルス (RSV) は、子供における下部呼吸性疾患の主要な原因であり、世界中の子供において細気管支炎および肺炎の予測可能な例年の流行をもたらす。該ウイルスは感染性が高く、いずれの年齢でも感染が起きる可能性がある。RSV感染およびその臨床的特徴に関する包括的な詳細は、"Respiratory Syncytial Virus", Ch. 38, B. N. Fields ed., Raven Press (1990)においてMcIntosh, K. およびR. M. Chanock、および"Textbook of Pediatric Disease" Feigin and Cherry, eds., W. B. Saunders, pgs 1247-1268 (1987)において Hall, C. B. による優れた近年の報告から得ることができる。

【0003】

RSVは世界中に分布している。RSVウイルスの疫学の最も顕著な特徴の一つは、上記のように、感染および疾患の一貫したパターンである。他の呼吸性ウイルスは、不規則な間隔で流行病を引き起こすか、または混成した流行病/流行病パターンを示すが、RSVは、大都市中心において毎年かなり大きな流行をもたらす唯一の呼吸性ウイルス病原体である。世界の温帯地域において、RSV流行病は、晚秋、冬または春に主に起こるが、夏には決して起こらない。コミュニティ内での感染の発生および蔓延は特徴的であり、容易に診断され、細気管支炎および小児肺炎ならびに急性下気道疾患を有する幼い子供の入院数においてシープな上昇をもたらす。大発生が起こる他の呼吸性ウイルス物質は、RSVと

同時期にめったに存在しない。

【0004】

一次RSV感染は非常に幼年において起こる。0～2才の幼児が最も罹患しやすく、一次罹患集団を代表する。該群において、5人のうち1人が感染において下部呼吸（咽頭下）疾患を発病し、この比率は再感染において同様である。自然感染の結果として、1歳までに25～50%の幼児が特異的抗体を有し、これは4～5歳までに100%に近付く。したがって、実際、就学前に全ての子供が感染する。

【0005】

年齢、性別、社会経済および環境的要因は全て、疾患の重篤度に影響を及ぼしする。RSV感染ケースの1～3%において入院が必要となり、通常、長期間（3週間まで）である。RSV感染の特に幼年期における高い罹患率は、また、後年、呼吸性の問題の発生に関係する。米国および他の先進国における現行の集中治療によると、正常対象に関する全死亡率は低い（入院対象の2%未満）。しかしながら、あまり発展していない国における死亡率は非常に高く、また、先進国においてでも、心臓病（チアノーゼ性先天的心臓病）または呼吸性疾患（気管支肺形成異常症）下にある幼児におけるようなある特定の危険性のある群において死亡率が高い。例えば、チアノーゼ性先天的心臓病の幼児における死亡率は37%ほどの高さであると報告されている。未熟な幼児において、RSV感染のために無呼吸期間が起り、稀な場合、神経学的または全身性損傷を引き起こしうる。重篤な下気道疾患（細気管支炎および肺炎）は、6ヶ月以下の患者において最も一般的である。該疾患から見たところ完全に回復したらしい幼児は、何年もの間、呼吸性異常の徴候（頻発する喘鳴、肺機能の低下、頻発する咳、喘息および気管支炎）を示しうる。

【0006】

RSVに対する免疫は短命であるらしく、したがって再感染が頻発する。免疫系がRSV感染および再感染を保護する機構はよく理解されていない。しかしながら、再感染が全ての年齢においてよく起り、時々、幼児において一次感染から回復したほんの数週間後に起こるので、免疫が部分的にだけ保護するというこ

とは明らかである。成人ならびに非常に小さい幼児においてRSV感染に応答して、血清および分泌抗体(IgA)の両方が検出された。しかしながら、ウイルス性FまたはG糖蛋白質に対する血清抗体、ならびに幼児(1-8ヶ月)に見られる中和抗体の力値は、より高齢の対象において見られる力値の15-25%である。これらの低い力値は、より幼い子供における重篤な感染の発生率の増加に寄与しうる。

【0007】

RSVウイルスに対する保護における血清抗体の役割の証拠は、疫学的ならびに動物研究から明らかになった。該ウイルスに自然に曝露される成人において、感染性は低血清抗体レベルとよく相関した。幼児において、母性伝播した抗体の力値は重篤な疾患に対する耐性と相関する(Glezen, W.P.ら、J. Pediatr. 98: 708-715 (1981))。他の研究は、下気道疾患の発生率および重篤度が高い血清抗体の存在において減少すること(McIntosh, K.ら、J. Infect. Dis. 138: 24-32 (1978))および受動的に投与された血清中和抗体の高い力値がRSV感染のコントラップモデルにおいて保護的であることを示したこと(Prince, G.A.ら、Virus Res. 3: 193-206 (1985))を示す。

【0008】

細胞性免疫を欠く子供は、正常な免疫系を有する子供とは対照的に、感染を抑えることができず、何ヶ月もの間ウイルスを有する。同様に、RSVウイルスで感染させたヌードマウスは、持続的にウイルスを有する。これらのマウスは、感作T細胞の養子移入によって治療できる(Cannon, M.J.ら、Immunology 62: 133-138 (1987))。

【0009】

要約すると、細胞性および体液性免疫はどちらも、感染、再感染およびRSV疾患に対する保護に関与するようであり、抗原性変量は制限されるが、複数の曝露後でさえ保護免疫は完全ではないようである。

【0010】

パラミオクソウイルス科(paramyoxoviridae)に属するRSVは、パラミクソウイルス(paramyxovirus)と同様の特性を有するマイナス鎖非断片化RNAウ

イルスである。しかしながら、形態的相違ならびに赤血球凝集素およびノイラミニダーゼ活性の欠失に基づいて、別のニューモウイルス属に置かれた。RSVは、多形態性であり、直径150-300nmの大きさの範囲にある。細胞の外膜から発芽することによってウイルスは成熟し、ビリオンは短い接近して間隔を空けた突出物または「スパイク」を有する膜結合粒子として現れる。RNAゲノムは、9.5kDa～160kDaの大きさの10個の独特的のウイルス性ポリペプチドをコードする (Huang, Y.T. および G.W. Wertz, J. Virol. 43: 150-157 (1982))。7つの蛋白質 (F、G、N、P、L、M、M2) がRSVビリオンに存在し、少なくとも3つの蛋白質 (F、GおよびSH) が感染した細胞の表面に発現する。F蛋白質に対する特異的抗体がイン・ビトロでのシンシチウム形成を阻害し、組換えF蛋白質を発現しているワクシニアウイルスに感染した細胞が他のRSVウイルス蛋白質の不在下でシンシチウムを形成するので、F蛋白質 (配列番号20) は最終的に、細胞融合の原因蛋白質として同定された。対照的に、G蛋白質に対する抗体はシンシチウム形成を阻害せずに、ウイルスの細胞に対する付着を妨げる。

【0011】

RSVは、2つの抗原性が別個のサブグループ、(A&B)に分けることができる (Mufson, M.A. ら、J. Gen'l. Virol. 66: 2111-2124 (1985))。該抗原性二形性は、主として表面付着 (G) 糖蛋白質に結合する (Johnson, R.A. ら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 84: 5625-5629 (1987))。AおよびB両群の系統は同時に循環するが、各集団は年々、予測不可能に変化しうる。したがって。効果的な治療は、該ウイルスの両サブグループを標的としなければならず、このため、後に議論されるように、mAb治療の標的抗原として高く保存された表面融合 (F) 蛋白質を選択する。

【0012】

RSVウイルスに対する中和抗体の誘導は、FおよびG表面糖蛋白質に限定されるようである。これらの2つの蛋白質のうち、F蛋白質は、RSVウイルスの異なる系統に対する保護と関連した交差反応性中和抗体の主要な標的である。さらに、マウスまたはコトンマウスのF蛋白質での実験的予防接種もまた、交差保

護をもたらす。ウイルスの系統およびサブグループを交差するF蛋白質の抗原性の関係はアミノ酸レベルの高度な相同性において反映される。対照的に、R S Vの2つのサブグループおよび種々の系統において、抗原二形性は主としてG糖蛋白質に関連付けられる。F蛋白質は、予測分子量6 8 - 7 0 k D a ; そのN末端にシグナルペプチド；C末端に膜アンカードメインを有し、ビリオンアセンブリーの前に感染細胞において蛋白質分解的に分裂してジスルフィド結合したF₂およびF₁を生じる。5つの中和エピトープがF蛋白質配列（配列番号2 0）内に同定され、2 0 5 - 2 2 5 ; 2 5 9 - 2 7 8 ; 2 8 9 - 2 9 9 ; 4 8 3 - 4 8 8および4 1 7 - 4 3 8残基に位置決定された。F蛋白質（配列番号2 0）における配列変化の頻度を決定するための研究は、中和エピトープの大部分がオーストラリア、ヨーロッパおよび米国の地域において3 0年間にわたって単離された2 3系統のR S Vウイルスの全てにおいて保存されていたことを示した。別の研究において、サブグループAまたはサブグループB系統での一次感染に対する4 3人の幼児および幼い子供の血清応答は、同種および異種F抗原に対する応答が有意に異なるものではなく、一方、サブグループAおよびB系統のG蛋白質は全く無関係であったことを示した。さらに、イン・ビトロでのウイルス媒介性細胞融合の抗体阻害対感染の阻害は動物モデルにおける保護と最もよく相関し、融合阻害は主にF蛋白質特異的抗体に限られる。

【0 0 1 3】

したがって、R S V感染の予防的処理は、高い危険性のある子供の群ならびに発展途上国の全ての子供について望ましい。しかしながら、R S V感染のためのワクチンは、現在、入手できない。1 9 6 0年代に試験された減弱した全ウイルスワクチンを取り囲む安全性が厳しくなり、ならびにより新しい候補サブユニットワクチンに関連した誘導される免疫病理学の可能性は、近い将来におけるワクチンの見通しが遠いことを明らかにする。今までのところ、1の薬物療法、幅広い範囲の抗ウイルス性であるリバビリン（Ribavirin）が認可された。リバビリンは、投与、穏かな毒性および疑わしい効力の問題のために最小限の容認を獲得したにすぎない。大多数の場合、入院した子供は薬物療法を受けず、非常に高価な集中的支持療法のみを受ける。R S V感染の治療のための安全で効果的かつ容

易に投与される薬物に対する要望があることは明らかである。

【0014】

ヒトにおける受動的抗体療法の使用は、よく報告されており、肝炎およびサイトメガロウイルスのような他の感染性疾患を治療するために用いられている。RSVに対する受動的抗体治療／予防の可能性は、動物モデルを用いてよく確立された。RSVを包含する感染性物質に対する動物における初期の受動的移入研究のほとんどは、ネズミmABを利用した。動物における研究は、明らかに、FおよびG糖蛋白質の両方に対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体が予防的または治療的に与えられた場合にRSVウイルス感染において受動的保護を授与できることを証明した（Princeら、前掲）。これらの研究において、中和FまたはG mAbのマウス、コトントラットまたはサルへの受動的移入は、肺におけるRSVウイルスの複製を有意に減少するか、または完全に防止する。しかしながら、上記のように、明らかに、F蛋白質は抗体療法のより重要な標的である。

【0015】

近年、FDAは、プールしたヒト血清から単離された静脈内ガンマグロブリン（IVIG）の使用を認可した。該研究の最初の報告が奨励されてきた（Groothuis, J.R.ら、Antimicrob. Agents Chemo. 35(7): 1469-1473 (1991)）。しかしながら、IVIGの一般的な欠点が存在し、制限するものではないが、かかる生産物はヒト血液由来であり、有効投与量を達成するためには、しばしば何グラムもの抗体が投与されなければならないという事実を包含する。

【0016】

別法では、モノクローナル抗体が使用された。かかるアプローチの利点は：より高濃度の特異的抗体が達成でき、それにより投与されるべきグロブリンの量を減少できること；直接的な血液生産物への依存を排除できること；調製物中の抗体のレベルをより均一に調節できることおよび投与経路を広げることができることを包含する。異種（例えば、ネズミ）由来のモノクローナル抗体を用いる受動的免疫療法が提案されたが（PCT出願第PCT/US94/08699号、公開番号第WO95/04081号を参照のこと）、外来抗体に対して向けられた患者の一部における望ましくない免疫応答の危険性を減少させるための1の選択

肢は、「ヒト化」抗体を使用することである。これらの抗体は、実質的にヒト起源であり、非ヒト起源の相補性決定領域（CDR）だけを有する。該アプローチの特に有用な例は、PCT出願第PCT/GB91/01554号、公開番号第WO92/04381号およびPCT出願第PCT/GB93/00725号、公開番号第WO93/20210号に開示されている。幼い子供におけるRSV感染の治療のためのヒト化抗体の効力を評価するための臨床試験は進行中である。

【0017】

第2およびより好ましいアプローチは、完全ヒトmAbを使用することである。不運にも、伝統的なハイブリドーマ技術によるヒトモノクローナル抗体の製造における成功例はほとんどない。実際、許容されるヒト融合パートナーは同定されておらず、ネズミミエローマ融合パートナーはヒト細胞とよく作動せず、不安定で低生産量のハイブリドーマ系統を生じる。しかしながら、分子生物学および免疫学における近年の進歩がこの度、ヒトmAb、特に外来感染性物質に向けられたヒトmAbを単離することを可能にした。

【0018】

RSV F蛋白質（配列番号20）に対する完全ヒトmAbは、該疾患の治療に望ましい選択を残している。かかるmAbのフラグメントの取得におけるいくつかの成功例が報告されたが（Barnbas, C.F.ら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89: 10164-10168 (1992); Crowe, J.E.ら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 91: 1386-1390 (1994) および1994年3月31日に公開番号第WO94/06448号として公開されたPCT出願第PCT/US93/08786号）、かかる結果の達成は容易ではない。しかしながら得られた新規なヒトmAbは、単独または免疫治療組成物を形成するための既存の分子と組み合わせて特に有用である。

当該分野において、RSVの予防または受動的治療に有用な予防的組成物に対する要望が存在する。

【0019】

（発明の開示）

発明の簡単な記載

1の態様において、本発明は、RSVのF蛋白質エピトープと特異的に反応し、RSV感染を中和できる完全ヒトモノクローナル抗体およびその機能的フラグメントを提供する。RSVウイルスのF蛋白質に特異的なこれらのヒトmABは、感染を受動的に治療または予防するのに有用でありうる。

【0020】

もう1つ別の態様において、本発明は、ヒト抗体配列のランダムコンビナトリアルクローニングによって生産され、纖維状ファージF_a bディスプレーライブリリーから単離されるRSVのF蛋白質に特異的な中和一本鎖F_vフラグメント(s_c F_V)に修飾を提供する。

またもう1つ別の態様において、第1のヒトドナー由来のヒトHおよびL鎖不変領域および第2のヒトドナーから由来のRSVのF蛋白質に対するヒト中和モノクローナル抗体由来のHおよびL鎖可変領域またはそのCDRを含有する新形態(reshaped)または改変抗体が提供される。

【0021】

さらにもう1つ別の態様において、本発明は、1(またはそれ以上)の改変または新形態抗体および医薬上許容される担体を含有する医薬組成物を提供する。

さらにもう1つ別の態様において、本発明は、少なくとも1投与量の免疫治療上有効量の本発明の新形態、改変またはモノクローナル抗体を少なくとも1つの付加的なモノクローナル、改変または新形態抗体と組み合わせて含んでなる医薬組成物を提供する。付加的な抗体が、本発明の対象抗体とは異なるRSV F蛋白質抗原のエピトープと反応することによって本発明の対象抗体と区別される抗-RSV抗体である特定の具体例が提供される。

【0022】

さらなる態様において、本発明は、RSV感染の予防的または治療的処理に有効な量の本発明の医薬組成物をヒトに投与することによる、ヒトにおけるRSV疾患の受動的免疫療法の方法を提供する。

さらにもう1つ別の態様において、本発明は、RSVのF蛋白質に対するヒト中和モノクローナル抗体(mAb)から由来のヒトおよび改変抗体(例えば、操

作された（engineered）抗体、CDR、FabまたはF(ab)₂フラグメント、またはその類似体）の組換え生産の方法および該組換え生産に有用な成分を提供する。これらの成分は、該抗体をコードしている単離核酸配列、組換えプラスミドでトランسفェクトされる宿主細胞（好ましくは哺乳動物細胞）におけるその発現を指示することのできる選択された調節配列の制御下で核酸配列を含有する組換えプラスミドを包含する。生産方法は、本発明のトランسفェクト宿主細胞系統をヒトまたは改変抗体が該細胞中で発現するような条件下で培養し、それから発現した生産物を単離することを含む。

【0023】

本発明のまた別の態様において、生物学的流体の試料を本発明のヒト抗体および改変抗体およびそのフラグメントと接触させ、該ヒト抗体（または改変抗体、またはそのフラグメント）とRSVとの間の結合の出現についてアッセイすることを特徴とする、ヒトにおいてRSVの存在を診断する方法である。

本発明の他の態様および利益は、詳細な記載およびその好ましい具体例においてさらに記載される。

【0024】

発明の詳細な記載

本発明は、RSVのF蛋白質と反応する有用なヒトモノクローナル抗体（およびそのフラグメント）、該抗体をコードしている単離核酸およびそれらの組換え生産のための種々の方法ならびにかかる抗体およびそのフラグメントの治療的、予防的および診断的使用を提供する。

【0025】

I. 定義

本明細書および請求の範囲で使用される場合、下記の用語は次のように定義付されている。

「改変抗体」なる語は、改変された免疫グロブリンコーディング領域によってコードされる蛋白質であって、選択された宿主細胞中における発現によって得られる蛋白質をいう。かかる改変抗体は、免疫グロブリン不变領域の全てまたは一部を欠く操作された抗体（例えば、キメラ、ヒト化、または新形態もしくは免

疫学的にエディットされたヒト抗体) またはそのフラグメント、例えば、Fv、Fa b またはF(ab')₂などである。

【0026】

「改変された免疫グロブリンコーディング領域」なる語は、本発明の改変抗体またはそのフラグメントをコードしている核酸配列をいう。

「新形態ヒト抗体」なる語は、第1のヒトモノクローナルドナー抗体由来の最少で少なくとも1つのCDRが第2のヒトアクセプター抗体中のCDRの代わりに用いられている改変抗体をいう。好ましくは、6個のCDR全てが置換されている。より好ましくは、第1のヒトドナーモノクローナル抗体由来の全抗原結合領域（例えば、Fv、Fa b またはF(ab')₂）が第2のヒトアクセプターモノクローナル抗体中の対応する領域の代わりに用いられている。最も好ましくは、第1のヒトドナー由来のFa b 領域が第2のヒトアクセプター抗体の適当な不变領域に作動可能に連結して、全長モノクローナル抗体を形成する。

【0027】

「第1の免疫グロブリンパートナー」なる語は、天然（または天然で生じる）CDR-エンコーディング領域がドナーヒト抗体のCDR-エンコーディング領域によって置換されているヒト枠組み構造またはヒト免疫グロブリン可変領域をコードしている核酸配列をいう。ヒト可変領域は、免疫グロブリンH鎖、L鎖（または両方の鎖）、その類似体または機能的フラグメントであることができる。抗体（免疫グロブリン）の可変領域内に位置するかかるCDR領域は、当該分野で既知の方法によって決定できる。例えば、Kabatら（Sequence of proteins of Immunological Interest, 第4版、U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)）は、CDRを位置決定するための規則を開示する。さらに、CDR領域／構造を同定するのに有用なコンピュータープログラムが知られている。

【0028】

「第2の融合パートナー」なる語は、それに対して第1の免疫グロブリンパートナーがフレーム内でまたは任意の慣用的なリンカーパターンによって融合される（すなわち、作動可能に連結された）蛋白質またはペプチドをコードしてい

るもう1つ別のスクレオチド配列をいう。好ましくは、融合パートナーは、免疫グロブリン遺伝子であり、そのような場合、「第2の免疫グロブリンパートナー」という。第2の免疫グロブリンパートナーは、同じ（すなわち、同種—第1および第2の変異抗体が同じ供給源由来である）または付加的な（すなわち、異種の）目的の抗体の全不变領域をコードしている核酸配列を包含しうる。それは、免疫グロブリンH鎖またはL鎖（または単一ポリペプチドの一部としての両鎖）でありうる。第2の免疫グロブリンパートナーは、特定の免疫グロブリンクラスまたはイソ型に限定されない。さらに、第2の免疫グロブリンパートナーは、F_ab、またはF_(a b)₂に見られるように、免疫グロブリン不变領域の一部を含みうる（すなわち、適切なヒト不变領域または枠組み構造領域の分離した部分）。第2の融合パートナーはまた、宿主細胞の外表面上に露出した膜内在性蛋白質をコードしている配列を例えれば、ファージディスプレーライブリヤーの一部として、または分析的または診断的検出のための蛋白質、例えれば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、β-ガラクトシダーゼなどをコードしている配列を含んでいてもよい。

【0029】

F_v、F_c、F_d、F_{a b}、F_{a b'}またはF_(a b')₂なる語は、それらの標準的な意味で用いられる。（例えれば、Harlowら、"Antibodies A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)を参照のこと。）

本明細書で使用される場合、「操作された抗体」なる語は、変異抗体の型、すなわち、全長の合成抗体（例えれば、抗体フラグメントとは対照的に、キメラ、ヒト化抗体、新形態または免疫学的にエディットされたヒト抗体）であって、ここに、選択されたアクセプター抗体のLおよび/またはH鎖可変ドメインの一部が選択されたエピトープに対して特異性を有する1以上のドナー抗体の類似部分によって置換されている抗体を示す。例えれば、かかる分子は、非修飾L鎖（またはキメラL鎖）と結合したヒト化H鎖またはその逆によって特徴付けられる抗体を包含しうる。操作された抗体はまた、ドナー抗体結合特異性を保持するために、アクセプター抗体Lおよび/またはH鎖可変ドメイン枠組み構造領域をコードしている核酸配列の改変によって特徴付けられうる。これらの抗体は、アクセプタ

—抗体由来の1以上のCDR（好ましくは全て）の本明細書に記載のドナー抗体由来のCDRによる置換を含むことができる。

【0030】

「キメラ抗体」なる語は、異種の種由来のアクセプター抗体から由来のLおよびH鎖不变領域と結合したドナー抗体から由来の天然に生じる可変領域（L鎖およびH鎖）を含有する操作された抗体の型をいう。

「ヒト化抗体」なる語は、非ヒトドナー免疫グロブリンから由来のそのCDRを有し、分子の残りの免疫グロブリン由来部分が1以上のヒト免疫グロブリンから由来である操作された抗体の型をいう。さらに、枠組み構造支持残基は、結合アフィニティーを保存するように改変されうる（例えば、Queenら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 86, 10029-10032 (1989), Hodgsonら、Bio/Technology, 9, 421 (1991)を参照のこと）。

【0031】

「免疫学的にエディットされた抗体」なる語は、エディットされた抗体で治療されるべき患者において抗体に対する免疫学的応答の可能性を減少させることを目的としたクローニング人工産物、生殖細胞系増強などに関する領域をエディットするようにドナーおよび／またはアクセプター配列において変化を起こした操作された抗体の型をいう。

「ドナー抗体」なる語は、ドナー抗体の抗原特異性および中和活性特徴と共に改変された免疫グロブリンコーディング領域および得られる発現した改変抗体を提供するに、その可変領域、CDRまたはその他の機能的フラグメントもしくはその類似体の核酸配列を第一の免疫グロブリンパートナーに与える抗体（モノクローナルまたは組換え）をいう。本発明における使用に適当な1のドナー抗体は、Fab Gλ-1と称されるヒト中和モノクローナル抗体のFabフラグメントである。Fab Gλ-1は、図3、4、8A-8Fおよび9A-9E（配列番号1-4、13および14）に示されるような可変LおよびH鎖DNAおよびアミノ酸配列Gλ-1を有するものとして定義される。

【0032】

「アクセプター抗体」なる語は、そのHおよび／またはL鎖枠組み構造領域お

および／またはそのHおよび／またはL鎖不変領域をコードしている核酸配列の全て（またはいずれか一部、好ましくは全て）を第一の免疫グロブリンパートナーに与える、ドナー抗体に遺伝学的に無関係の供給源由来の抗体（モノクローナルまたは組換え）をいう。好ましくは、ヒト抗体はアクセプター抗体である。

【0033】

「CDR」なる語は、免疫グロブリンHおよびL鎖の超可変領域である抗体の相補性決定領域アミノ酸配列として定義される（例えば、Kadatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第4版、U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)を参照）。免疫グロブリンの可変部分において3つのH鎖および3つのL鎖CDR領域（またはCDR領域）がある。したがって、本明細書で使用される場合、「CDR」なる語は、3つのH鎖CDRの全て、または3つのL鎖CDRの全て（または適当ならば、全Hおよび全L鎖CDRの両方）をいう。CDRは、抗原またはエピトープに対する抗体の結合のための大量の接触残基を提供する。本発明における目的のCDRは、ドナー抗体可変HおよびL鎖配列由来であり、天然に生じるCDRの類似体を包含し、その類似体はまた、それらが由来するドナー抗体と同じ抗原結合特異性および／または中和能力を共有または保持する。

【0034】

「抗原結合特異性または中和能力を共有する」なる語は、例えば、Fab G λ -1はある特定のレベルの抗原アフィニティーによって特徴付けられるが、適当な構造環境においてFab G λ -1の核酸配列によってコードされるCDRはより低いまたは高いアフィニティーを有する可能性があることを意味する。にもかかわらず、かかる環境においてFab G λ -1のCDRは、無傷Fab G λ -1と同じエピトープを認識するであろうことが予想される。「機能的フラグメント」は、そのフラグメントが由来する抗体と同じ抗原結合特異性および／または中和能力を保持する、部分的HまたはL鎖可変配列（例えば、免疫グロブリン可変領域のアミノまたはカルボキシ末端での少量の欠失）である。

【0035】

「類似体」は、少なくとも1つのアミノ酸によって修飾されたアミノ酸配列で

あり、ここに、該修飾は、化学的修飾であることができ、または2、3個のアミノ酸（すなわち、10個未満）の置換または再配置であることができ、その修飾は、該アミノ酸配列が非修飾配列の生物学的特徴、例えば、抗原特異性および高アフィニティーを保持することを可能にする。例えば、ある種のエンドヌクレアーゼ制限部位をCDR—エンコーディング領域内または周囲に作成する場合、置換によって（サイレント）突然変異を構築することができる。

【0036】

類似体は、また、対立遺伝子変異として生じてもよい。「対立遺伝子変異または修飾」は、本発明のアミノ酸またはペプチド配列をコードしている核酸配列における改変である。かかる変異または修飾は、遺伝コードの縮重に起因するか、または、所望の特徴を提供するように故意に操作されるものである。これらの変異または修飾は、いずれかのコードされたアミノ酸配列における改変を生じても生じなくてもよい。

【0037】

「エフェクター剤」なる語は、改変抗体、および/またはドナー抗体の天然もしくは合成のLまたはH鎖あるいはドナー抗体の他のフラグメントが常法により結合しうる非蛋白質担体分子をいう。かかる非蛋白質担体は、診断分野において使用される慣用的な担体、例えば、ポリスチレンまたは他のプラスチックビーズ、多糖類、例えば、BIAcore (Pharmacia) システムにおいて使用されるような多糖類、または医学分野において有用であって、ヒトおよび動物への投与に安全な他の非蛋白質物質を包含することができる。他のエフェクター剤は、重金属原子または放射性同位体をキレートするための大環状環を包含しうる。かかるエフェクター剤、例えば、ポリエチレングリコールは、また、改変抗体の半減期を増加するのに有用でありうる。

【0038】

I I . コンビナトリアルクローニング

上記のように、いくつかの問題が、ハイブリドーマ技術のヒトモノクローナル抗体の作成および単離への直接的応用を阻害してきた (G. KohlerおよびC. Milstein, Nature, 256: 495-497 (1975))。これらのなかでも、ハイブリドーマ細

胞系統を形成するために用いられる適当な融合パートナーミエローマ細胞系統がないことならびに形成された場合でもかかるハイブリドーマの安定性が乏しいことである。これらの欠点は、末梢循環におけるウイルス特異的B細胞の不足のため、RSVの場合においてさらに悪化する。したがって、コンビナトリアルクローニングの分子生物学的アプローチが好ましい。

【0039】

コンビナトリアルクローニングは、一般的に、PCT公開第WO 90/14430号に開示されている。簡単に言えば、コンビナトリアルクローニングの目的は、細菌細胞の集団にヒト細胞、組織または器官の免疫学的遺伝子キャパシティーを移入することである。免疫適格性の細胞、組織または器官を用いることが好ましい。特に有用な供給源は、限定するものではないが、脾臓、胸腺、リンパ節、骨髄、扁桃および末梢血リンパ球を包含する。細胞は、イン・ビトロでRSVによって刺激されていてもよく、または免疫応答を生じたことがわかっているドナーもしくはHIV⁺であるが無症候性のドナーから選択される。

【0040】

ドナー細胞から単離された遺伝子情報は、DNAまたはRNAの形態であることができ、都合のよいことには、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）または同様の技術によって増幅される。RNAとして単離される場合、遺伝子情報は好ましくは、増幅前に逆転写によってcDNAに変換される。増幅は総合的であるかまたはより詳細に調整ができる。例えば、PCRプライマー配列の注意深い選択によって、免疫グロブリン遺伝子または遺伝子のクラス内のサブセットの選択的増幅を達成することができる。

【0041】

いったん成分遺伝子配列、この場合、種々のHおよびL抗体鎖の可変領域をコードしている遺伝子を得たならば、LおよびH鎖遺伝子をランダムな組み合わせで結合してランダムコンビナトリアルライブラーを形成する。コンビナトリアルクローニングを容易にするための種々の組換えDNAベクター系が記載されている（例えば、PCT公開第WO 90/14430前掲；ScottおよびSmith, Science 249:386-406 (1990)；または米国特許第5223409号参照）。コンビ

ナトリアルライブラーを作成すると、発現後、都合のよいことには生産物をR S V F蛋白質でバイオパンニングすることによって、または必要ならば、より詳細に下記するようなエピトープ遮断バイオパンニングによってスクリーンできる。

本明細書に記載するように、コンビナトリアルクローニングおよびスクリーニングには1本鎖抗体を使用することが好ましく、次いで、所望の候補分子の選択後に、それらを全長mA bに変換する。しかしながら、mA bのF a bフラグメントもまた、クローニングおよびスクリーニングに使用することができる。

【0042】

I III. 抗体フラグメント

本発明は、RSVのF蛋白質に向けられた誘導全長mA bに対するsc Fv、F a bまたはF (a b')₂フラグメントの使用を意図する。これらのフラグメントは独立して、RSV-媒介性症状に対するイン・ビボでの保護的および治療的物質としてまたはRSV診断の一部としてイン・ビトロで有用でありうるが、それらは、新形態ヒト抗体の成分として本明細書において使用される。sc Fvフラグメントは、L-リンカー-HまたはH-リンカー-L配向のいづれかにおいて約12アミノ酸のリンカーによって連結されたLおよびH鎖可変領域を含有する。F a bフラグメントは、全L鎖とH鎖のアミノ末端部分を含有し；F (a b')₂フラグメントは付加的なジスルフィド結合によって結合された2つのF a bフラグメントによって形成されたフラグメントである。RSV結合モノクローナル抗体は、コンビナトリアルファージライブラーから得ることのできるsc FvまたはF a bフラグメントの供給源を提供する（例えば、Winterら、Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)またはBarbasら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 89, 10164-10168 (1992)参照、どちらもこれにより、出典明示により全体として組み込まれる）。

【0043】

I V. 目的の抗-R S V抗体アミノ酸およびスクレオチド配列

F a b G λ-1または本明細書に記載の他の抗体は、ドナー抗体の抗原結合特異性によって特徴付けられる種々の改変抗体の設計および獲得に有用な配列、

例えば、可変Hおよび/またはL鎖ペプチド配列、枠組み構造配列、CDR配列、機能的フラグメント、およびその類似体、およびそれをコードしている核酸配列を与える。

【0044】

一例として、このように本発明は、RSVヒトF_ab G_λ-1A由来の可変L鎖および可変H鎖配列およびそれから由来の配列を提供する。F_ab G_λ-1AのH鎖可変領域は、図4、8A-8Fおよび10A-10B（配列番号3-4、13および15）に示される。

【0045】

可変L鎖およびH鎖ペプチド配列をコードしている本発明の核酸配列またはそのフラグメントは、また、CDRまたは枠組み構造領域をコードしている核酸配列内における特定の変化の突然変異誘発性導入、および発現用プラスミド中への得られた修飾または融合核酸配列の組み込みに有用である。例えば、枠組み構造およびCDR-エンコーディング領域のヌクレオチド配列におけるサイレント置換は、突然変異を起こさせたCDR（および/または枠組み構造）領域の挿入を容易にする制限酵素部位を作成するために使用することができる。これらのCDR-エンコーディング領域は、本発明の新形態ヒト抗体の構築に用いてもよい。

【0046】

遺伝コードの縮重を考慮して、本発明の可変HおよびL鎖アミノ酸配列およびCDR配列ならびにドナー抗体の抗原特異性を共有するその機能的フラグメントおよび類似体をコードする種々のコーディング配列が構築されうる。可変鎖ペプチド配列またはCDRをコードしている本発明の単離核酸配列またはそのフラグメントは、第2の免疫グロブリンパートナーと作動可能に結合される場合、改変抗体、例えば、キメラまたはヒト化抗体、または本発明の他の操作された抗体を生産するために使用することができる。

【0047】

本明細書に記載の改変抗体の一部をコードしている単離核酸配列のほかに、天然CDR-エンコーディング配列に相補的な配列またはCDR-エンコーディング領域の周囲のヒト枠組み構造領域に相補的な配列のような他のかかる核酸配列

が本発明に包含されることに注目すべきである。かかる配列は、遺伝コードの縮重によって図3および4（配列番号2および4）に示されるのと同じアミノ酸配列をコードできる全ての核酸配列を包含する。図6および7（配列番号5-12）は、かかる配列の提示を提供する。本発明に包含される他の有用なDNA配列は、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下（T. Maniatisら、Molecular Cloning (A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982), pages 387-389参照) でG λ -1抗体をコードしているDNA配列（例えば、図3、4、8A-8F~11（配列番号1-4、13-16）の配列）にハイブリダイズし、該抗体の抗原結合性を保持する配列を包含する。1のかかるストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の例は、4 x SSC、65°Cでハイブリダイゼーションし、次いで、0.1 x SSC、65°Cで1時間洗浄する。別法では、例示的ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、4 x SSC中42°Cである。好ましくは、これらのハイブリダイズするDNA配列は、少なくとも約18ヌクレオチド長、すなわち、およそのCDRの大きさである。

【0048】

V. 改変された免疫グロブリンコーディング領域および改変抗体

改変された免疫グロブリンコーディング領域は、キメラ抗体、ヒト化、新形態および免疫学的にエディットされたヒト抗体のような操作された抗体を包含する改変抗体をコードする。所望の改変された免疫グロブリンコーディング領域は、アクセプター免疫グロブリンパートナー中に挿入される、RSV抗体、好ましくは、本発明によって提供されるような高アフィニティー抗体の抗原特性を有するペプチドをコードするCDR-エンコーディング領域をscFv領域の形態で含有する。

【0049】

アクセプターが免疫グロブリンパートナーである場合、上記のように、それは、目的の第2の抗体領域、例えば、Fc領域をコードしている配列を包含する。免疫グロブリンパートナーは、また、それに対してLまたはH鎖不变領域がフレーム内でまたはリンカー配列の手段によって融合する別の免疫グロブリンをコードする。

ドしている配列を包含しうる。R S Vの機能的フラグメントまたは類似体に向けられた操作された抗体は、同じ抗体との強化された結合をもたらすように設計されていてもよい。

【0050】

免疫グロブリンパートナーは、また、免疫グロブリンパートナーが常法により作動可能に連結されうる非蛋白質担体分子を包含する上記のエフェクター剤と結合していてもよい。

免疫グロブリンパートナー、例えば、抗体配列とエフェクター剤との間の融合または結合は、いずれかの適当な手段によって、例えば、慣用的な共有結合またはイオン結合、蛋白質融合、またはヘテロ二官能性交差リンカー、例えば、カルボジイミド、グルタルアルデヒドなどによるものであってもよい。かかる技術は当該分野で既知であり、従来の化学および生物化学テキストに容易に記載されている。

【0051】

さらに、単に第2の免疫グロブリンパートナーとエフェクター剤の間に所望の量の空間を提供するにすぎない慣用的なリンカー配列もまた、改変された免疫グロブリンコーディング領域中に構築されてもよい。かかるリンカーの設計は当業者によく知られている。

さらに、本発明の分子のシグナル配列を発現を増加するように修飾してもよい。例えば、F a b G λ - 1 H鎖配列由来のシグナル配列およびCDRを有する新形態ヒト抗体は、キャンパス (Campath) リーダー配列のような別のシグナル配列で置換された元のシグナルペプチドを有していてもよい (Page, M. J. ら、BioTechnology 9:64-68 (1991))。

例示的な改変抗体、新形態ヒト抗体は、第2のヒト抗体から由来の不变H領域 $C_{H-1} - C_{H-3}$ に融合したF a b G λ - 1の抗原特異性を有する可変Hおよび全L鎖ペプチドまたは蛋白質配列を含有する。

【0052】

またさらなる具体例において、本発明の操作された抗体は、それに付加的な物質を接着させていてもよい。例えば、組換えDNA技術の手法を用いて、F c フ

ラグメントまたは完全な抗体分子の $C_{H-2} C_{H-3}$ ドメインが酵素または他の検出可能な分子（すなわち、ポリペプチドエフェクターまたはリポーター分子）によって置換された本発明の操作された抗体を生産してもよい。

本発明のもう 1 つ別の所望の蛋白質は、全長の H および L 鎮を有する完全な抗体分子、またはそのいずれかの分離したフラグメント、例えば、F_a b または F_(a b') 2 フラグメント、H 鎮 2 量体、またはいずれかのその最小組換えフラグメント、例えば、F_v または 1 本鎖抗体 (S C A) または選択されたドナー F_{a b G \lambda - 1} と同じ特異性を有するいずれか他の分子を含んでいてもよい。かかる蛋白質は、改変抗体の形態で使用されてもよく、またはその非融合形態で使用されてもよい。

【0053】

免疫グロブリンパートナーがドナー抗体と異なる抗体、例えば、いずれかのイソ型または免疫グロブリン枠組み構造もしくは不变領域のクラス由来であるときは必ず、操作された抗体が生じる。操作された抗体は、1 の供給源、例えば、アクセプター抗体由来の免疫グロブリン (Ig) 不变領域および可変枠組み構造領域、およびドナー抗体、例えば、本明細書に記載の抗-RSV 抗体由来の 1 以上の（好ましくは、全ての）CDR を含むことができる。さらに、核酸またはアミノ酸レベルにおけるアクセプター mA b L および／または H 可変ドメイン枠組み構造領域またはドナー CDR 領域の改変、例えば、欠失、置換または付加は、ドナー抗体抗原結合特異性を保持するために、または潜在的な免疫原性を減少させるために作成されうる。

【0054】

かかる操作された抗体は、RSV mA b (記載のように修飾されていてもよい) の可変 H および／または L 鎮の 1 つ（または両方）あるいは下記で同定される H または L 鎮 CDR の 1 以上を用いるように設計される。本発明の操作された抗体は、中和性であり、すなわち、それらは、望ましくは、RSV 感染の動物モデルにおいてイン・ビトロおよびイン・ビボでウイルス増殖を阻害する。

【0055】

かかる操作された抗体は、RSV 抗体機能的フラグメントに融合したヒト H お

よりL鎖不变領域を含有する新形態ヒト抗体を包含しうる。適當なヒト（または他の動物）アクセプター抗体は、慣用的なデータベース、例えば、KABAT[®]（登録商標）データベース、Los AlamosデータベースおよびSwiss Proteinデータベースから、ドナー抗体のヌクレオチドおよびアミノ酸配列に対するホモロジーによって選択されたものであってもよい。ドナー抗体の枠組み構造領域に対するホモロジー（アミノ酸に基づく）によって特徴付けられるヒト抗体は、ドナーCDRを挿入するためのH鎖不变領域および／またはH鎖可変枠組み構造領域を提供するのに適當でありうる。L鎖不变または可変枠組み構造領域を与えることのできる適當なアクセプター抗体は、同様に選択されうる。アクセプター抗体HおよびL鎖が同じアクセプター抗体から由来する必要がないことに注目すべきである。

【0056】

望ましくは、異種枠組み構造および不变領域をヒト免疫グロブリンクラスおよびイソ型、例えば、IgG（4のうちサブタイプ1）、IgM、IgAおよびIgEから選択する。Fcドメインは、天然配列に限定されないが、機能を改変する当該分野で既知の突然変異変種を包含する。例えば、突然変異は、ある特定のIgG抗体のFcドメインにおいてFc-媒介性補体およびFc受容体結合を減少させ（A.R. Duncanら、Nature, 332:563-564 (1988); A.R. DuncanおよびG. Winter, Nature, 332:738-740 (1988); M.L. Alegreら、J. Immunol. 148: 3461-3468 (1992); M.-H. Taoら、J. Exp. Med. 178:661-667 (1993); およびV. Xuら、J. Biol. Chem., 269:3469-2374 (1994)）；クリアランス率を改変し（J. K. Kimら、Eur. J. Immunol., 24: 542-548 (1994)）；構造的異種性を減少させる（S. Angalら、Mol. Immunol. 30: 105-108 (1993)）ことが記載された。また、IgMの尾部セグメントの付加または他の突然変異（R.I.F. SmithおよびS.L. Morrison, Biotechnology 12: 683-688 (1994); R.I.F. Smithら、J. Immunol., 154: 2226-2236 (1995)）あるいはIgAの尾部セグメントの付加（I. Karivら、J. Immunol., 157: 29-38 (1996)）による抗体のオリゴマー化のような他の修飾が可能である。しかしながら、アクセプター抗体は、ヒト免疫グロブリン蛋白質配列のみを含む必要はない。例えば、ヒト免疫グロブリン鎖のDNA配列エンコ

ーディング部分がポリペプチドエフェクターまたはレポーター分子のような非免疫グロブリンアミノ酸配列をコードしているDNA配列に融合している遺伝子を構築してもよい。

【0057】

したがって、改変抗体は、好ましくは、天然ヒト抗体またはそのフラグメントの構造を有し、効果的な治療的用途、例えば、ヒトにおけるRSV媒介疾患の治療または診断的用途に必要とされる特性の組み合わせを有する。

改変抗体がさらに、ドナー抗体の特異性および高アフィニティーに決して影響を及ぼすことなく、可変ドメインアミノ酸における変化によって修飾されうることは、当業者に理解されるであろう（すなわち、類似体）。HおよびL鎖アミノ酸が可変ドメイン構造またはCDRまたはその両方において他のアミノ酸によって置換されうることは予想される。特に、本明細書における実施例に説明されるように、かかる再構築された配列の免疫学的エディティングが好ましい。

【0058】

さらに、可変または不变領域は、上記のように、本発明の分子の選択的特性を強化または減少するように改変されうる。例えば、2量化、Fc受容体への結合、または補体を結合し活性化する能力である（例えば、Angalら、Mol. Immunol., 30: 105-108 (1993); Xuら、J. Biol. Chem. 269: 3469-3474 (1994); およびWinterら、EP 307, 434-B参照）。

かかる抗体は、下記のように、RSV媒介疾患の予防および治療に有用である。

【0059】

V I. 改変抗体および操作された抗体の生産

本発明の得られる新形態ヒト抗体は、組換え宿主細胞、例えば、COS、CHOまたはミエローマ細胞において発現できる。慣用的な発現ベクターまたは組換えプラスミドは、改変抗体のこれらのコーディング配列を宿主細胞中における複製および発現および/または宿主細胞からの分泌を制御できる慣用的な調節配列と作動可能に結合して配置することによって生産される。調節配列は、他の既知の抗体から得ることのできるプロモーター配列、例えば、CMVプロモーター、

およびシグナル配列を包含する。同様に、相補的抗体LまたはH鎖をコードするDNA配列を有する第2発現ベクターを生産することができる。好ましくは、該第2発現ベクターは、コーディング配列および選択マーカーが関係することを除き、第1のベクターと同一である。これは、可能な限り、各ポリペプチド鎖が機能的に発現されることを保証する。別法では、改変抗体のHおよびL鎖コーディング配列は、単一ベクター上に残存しうる。

【0060】

選択された宿主細胞は、慣用的な技術によって、第一および第二のベクターと同時トランスフェクトして（または単純に単一ベクターでトランスフェクトして）、組換えまたは合成LおよびH鎖の両方を含む本発明のトランスフェクト宿主細胞を作成する。次いで、トランスフェクト細胞を慣用的な技術によって培養して、本発明の操作された抗体を生産する。組換えH鎖およびL鎖の両方のアソシエーションを包含する抗体の生産は、固相酵素免疫アッセイ（ELISA）またはラジオイムノアッセイ（RIA）のような適当なアッセイによって培養物中において測定される。同様の慣用的な技術を用いて、本発明の他の改変抗体および分子を構築してもよい。

【0061】

本発明の方法および本発明の組成物の構築において用いられるクローニングおよびサブクローニング段階に適当なベクターは、当業者によって選択されるうる。例えば、慣用的なpUCシリーズのクローニングベクターが用いられる。使用される1のベクターはpUC19であり、Amersham (Buckinghamshire, United Kingdom) またはPharmacia (Uppsala, Sweden) のような供給会社から市販されている。容易に複製でき、クローニング部位および選択遺伝子（例えば、抗生物質耐性）を豊富に有し、取り扱いが簡単ないずれのベクターをクローニングに用いてもよい。したがって、クローニングベクターの選択は、本発明における制限的因素ではない。

【0062】

同様に、本発明による操作された抗体の発現に用いられるベクターは、いずれかの慣用的なベクターから当業者によって選択されうる。好ましいベクターは、

例えば、pCDまたはpCNを包含する。ベクターは、また、選択された宿主細胞中における異種DNA配列の複製および発現を指示する選択された調節配列（例えば、CMVプロモーター）を含有する。これらのベクターは、操作された抗体または改変された免疫グロブリンコーディング領域をコードする上記のDNA配列を含有する。さらに、ベクターは、即座の操作に望ましい制限部位の挿入によって修飾された選択された免疫グロブリン配列を組み込んでいてもよい。

【0063】

発現ベクターは、また、異種DNA配列、例えば、哺乳動物ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子（DHFR）の発現を增幅するのに適当な遺伝子によって特徴付けられる。他の好ましいベクター配列は、ウシ成長ホルモン（BGH）およびベータグロビンプロモーター配列（betaglopro）のようなポリアデニル化（ポリア）シグナル配列を包含する。本明細書において有用な発現ベクターは、当業者によく知られた技術によって合成されうる。

かかるベクターの成分、例えば、レプレコン、選択遺伝子、エンハンサー、プロモーター、シグナル配列などは、選択された宿主中における組換えDNAの生産物の発現および／または分泌を指示するのに使用するために、商業的または天然起源から得ても、または既知の手法によって合成されてもよい。哺乳動物、細菌、昆虫、酵母および真菌発現の分野において多数の型が知られている他の適当な発現ベクターもまた、この目的のために選択されうる。

【0064】

本発明は、また、操作された抗体またはその改変された免疫グロブリン分子のコーディング配列を含有する組換えプラスミドでトランスフェクトされた細胞系統を包含する。これらのクローニングベクターのクローニングおよび他の操作に有用な宿主細胞もまた、慣用的である。しかしながら、もっとも望ましいことに、イー・コリ（E. coli）の種々の系統由来の細胞は、クローニングベクターの複製および本発明の改変抗体の構築における他の段階に使用される。

本発明の操作された抗体または改変抗体の発現に適当な宿主細胞または細胞系統は、好ましくは、CHO、COS、纖維芽細胞（例えば、3T3）および骨髄細胞のような哺乳動物細胞、より好ましくは、CHOまたは骨髄細胞である。ヒ

ト細胞を使用してもよく、したがって分子をヒトグリコシル化パターンで修飾できる。別法では、他の真核細胞系統を用いてもよい。適当な哺乳動物宿主細胞の選択および形質転換、培養、増幅、スクリーニングならびに生産物生産および精製の方法は当該分野で既知である。例えば、SambrookらMolecular Cloning (A Laboratory Manual), 2nd edit., Cold Spring Harbor Laboratory (1989)を参照のこと。

【0065】

細菌細胞は、本発明の組換え s c F v、F a b およびMA b の発現に適当な宿主細胞として有用であることが証明されうる（例えば、Plueckthun, A., Immuno 1. Rev., 130, 151-188 (1992)）。F a b は通常グリコシル化せず、発現を輸出するように操作でき、それにより、ミスフォールディングを容易にする高濃度を低下させることができるので、細菌細胞において発現された蛋白質が非フォールディングまたは不適当なフォールディング形態あるいは非グリコシル化形態である傾向は、たいして問題ではない。にもかかわらず、細菌細胞において生産されたいずれの組換えF a b も、抗原結合能力の保持についてスクリーンされるであろう。細菌細胞によって発現された分子が適当に折りたたんだ形態で生産された場合、その細菌細胞は望ましい宿主であろう。例えば、発現に使用されるイー・コリの種々の系統は、バイオテクノロジーの分野において宿主細胞としてよく知られている。ビー・ズブチリス (*B. subtilis*)、ストレプトミセス (*Streptomyces*) の種々の系統、他の細菌などもまた、使用されうる。

【0066】

所望により、当業者に知られた酵母細胞もまた、昆虫細胞、例えば、ドロソフィラ (*Drosophila*) およびレピドプテラ (*Lepidoptera*) およびウイルス発現系と同様に宿主細胞として利用可能である（例えば、Millerら、Genetic Engineering, 8, 277-298, Plenum Press (1986) およびそこに引用される参考文献を参照のこと）。

本発明のベクターを構築しうる一般的な方法、本発明の宿主細胞を生産するのに必要なトランスフェクション方法および本発明の改変抗体をかかる宿主細胞から生産するのに必要な培養法は全て、慣用的な技術である。同様に、いったん生

産されたならば、本発明の改変抗体は、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを包含する当該分野の標準的な手法にしたがって、細胞培養内容物から精製されうる。かかる技術は、当該分野の技術内であり、本発明を制限しない。

【0067】

新形態抗体のまた別の発現方法は、トランスジェニック動物における発現を利用しうる。例示的系は、米国特許第4873316号に記載されている。該参考文献に記載された発現系は、動物のカゼインプロモーターを使用し、哺乳動物中にトランスジェニック的に組み込まれた場合、雌が所望の組換え蛋白質をその乳中に生産することが可能である。

【0068】

いったん望ましい方法によって発現したならば、次いで、操作された抗体を適当なアッセイを用いてイン・ビトロ活性について試験する。現在、RSVに対する改変抗体の定性および定量的結合を評価するために、慣用的なELISAアッセイ様式が用いられる。さらに、他のイン・ビトロアッセイおよびイン・ビボ動物モデルもまた、通常のクリアランスメカニズムにもかかわらず体における改変抗体の持続性を評価するために行われるその後のヒト臨床的研究の前に、中和効力を確かめるために用いてもよい。

【0069】

VII. 治療的／予防的用途

本発明はまた、本明細書に記載の1以上の抗体（改変、新形態、モノクローナルなど）またはそのフラグメントを包含する有効量の抗体を投与することを特徴とするRSVに関連した症状を体験しているヒトを治療する方法に関する。

本発明の分子の使用によって誘導される治療的応答は、RSVへの結合により生じ、したがってその後、RSV繁殖を阻害する。したがって、本発明の分子は、治療的用途に適した調製物および処方における場合、RSV感染を体験しているヒトに大いに望ましい。例えば、季節的な症状の発現などを治療する場合、より長期の治療が望ましい。投与量および治療の持続期間は、ヒト循環における本発明の分子の相対的な存続期間に關係し、治療されるべき状態および患者の総体

的な健康に依存して当業者によって調整されることがある。

【0070】

本発明の改変抗体、抗体およびそのフラグメントは、また、単独または他の抗体、特に、F蛋白質上の他のエピトープまたは他のR S V標的抗原と反応するヒトまたはヒト化mA bを予防的薬剤として一緒に使用してもよい。

本発明の治療および予防的薬剤の投与様式は、宿主に薬剤をデリバリーするいずれかの適当な経路であってもよい。本発明の改変抗体、抗体、操作された抗体およびそのフラグメント、および医薬組成物は、非経口投与、すなわち、皮下、筋内、静脈内または鼻腔内に特に有用である。

【0071】

本発明の治療および予防的薬剤は、本発明の有効量の改変抗体を活性成分として医薬上許容される担体中において含有する医薬組成物として調製されうる。注射用に準備された形態において、好ましくは生理学的pHに緩衝化された抗体を含有する水性懸濁液または溶液が好ましい。非経口投与用組成物は、一般に、医薬上許容される担体、好ましくは水性担体中に溶解した本発明の操作された抗体またはそのカクテルの溶液を含むであろう。種々の水性担体を用いてもよく、例えば、0.4%セーライン、0.3%グリシンなどである。これらの溶液は、滅菌状態であり、一般に、粒子物質を含有しない。これらの溶液は、慣用的なよく知られた滅菌技術（例えば、ろ過）によって滅菌されうる。組成物は、およその生理学的条件に必要とされるようなpH調整剤および緩衝化剤などの医薬上許容される補助物質を含有しうる。かかる医薬処方中における本発明の抗体の濃度は、幅広く変化することができ、すなわち、約0.5重量%より少ないものから、通常または少なくとも1重量%、1.5または2.0重量%ほどの大きさまでで変化でき、選択された特定の投与様式にしたがって、主に流体容積、粘度などに基づいて選択されるであろう。

【0072】

したがって、筋内注射用の本発明の医薬組成物は、1mL滅菌緩衝化水および約1ng～約100mg、例えば、約50ng～約80mgまたはより好ましくは、約5mg～約75mgの本発明の操作された抗体を含有するように調製でき

た。同様に、静脈内注入用の本発明の医薬組成物は、約250mlの滅菌リンガーリン液および約1mg～約75mg/mlおよび好ましくは5mg～約50mg/mlの本発明の操作された抗体を含有するように調製できた。非経口投与可能な組成物を調製するための実際の方法は、よく知られているか、または当業者に明らかであり、例えば、"Remington's Pharmaceutical Science", 15版, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvaniaにおいてより詳細に記載されている。

【0073】

医薬調製物における場合、本発明の治療剤および予防が単位投与形態で存在することが好ましい。適当な治療上有効投与量は、当業者によって容易に決定できる。ヒトまたは他の動物において炎症性疾患を効果的に治療するために、体重70kgあたり約0.1mg～約20mgの1投与量の本発明の蛋白質または抗体を非経口、好ましくは、静脈内または筋内投与すべきである。かかる投与量を、必要ならば、内科医によって適宜選択された適当な時間間隔で繰り返してもよい。

【0074】

本発明の改変抗体および操作された抗体は、また、RSV媒介疾患の決定またはかかる疾患の治療の進行を追跡するためののような診断的計画に用いてもよい。診断的試薬として、これらの改変抗体をELISAおよび血清、血漿または他の適当な組織中のRSVレベルまたは培養液中のヒト細胞によるその放出の測定のための他の慣用的なアッセイ様式において使用するために慣用的にラベルしてもよい。改変抗体を用いるアッセイの性質は慣用的であり、該開示を制限しない。

【0075】

本明細書に記載の抗体、改変抗体またはそのフラグメントは、保管のために凍結乾燥でき、使用前に適当な担体中で復元できる。該技術は、慣用的な免疫グロブリンで効果があることがわかっており、当該分野で既知の凍結乾燥および復元技術を用いることができる。

下記の実施例は、例示的な操作された抗体の構築および適当なベクターおよび宿主細胞中におけるその発現を包含する本発明の種々の態様を説明するものであ

り、本発明の範囲を制限するものとして解釈されるべきではない。全てのアミノ酸は慣用的な3文字表記または1文字表記によって示される。全ての必要な制限酵素、プラスミドおよび他の試薬および材料は、別記しない限り、商業的に入手可能である。全ての一般的なクローニングライゲーションおよび他の組換えDNA法は、T. Maniatisら(上掲) またはSambrookら(上掲) において行われたとおりであった。

【0076】

実施例1：G λ -1 scFv-1の単離

1本鎖(scFv)ライブラリーを故意にRSVに曝露した個体から調製し、記載の手法にしたがって組換えRSV-F蛋白質に対して選択した(R.H. Jacksonら、Protein Engineering, A Practical Approach, A.R. Reesら編、Oxford University Press, chapter 12, pp. 277-301, 1992; H.R. Hoogeboomら、Nucl. Acid Res., 19: 4133-4137 (1991); J.D. Marksら、J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991))。簡単に言えば、リンパ球を曝露後15日目に採取した血液試料から単離した。リンパ球から単離したRNAをファージディスプレーのためのscFvエンコーディングレパートリーの調製に用いた。V領域プライマーのセットをH鎖ドメイン1 IgGおよびIgMならびにL鎖C-κおよびC-λのための不变領域プライマーと対にし、次いで、オーバーラップPCRによってscFv VH-VL配向において15アミノ鎖スペーサー(グリシン₄-セリン)₃(配列番号21)と連結した(プライマーの記載についてJ.D. Marksら(上掲)を参照)。

【0077】

得られた4つのscFvレパートリー(IgGおよびIgMを有するV-κ、IgGおよびIgMを有するV-λ)をpHEN1(H.R. Hoogenboomら(上掲))に類似したファージミドベクター中にクローニングし、scFvのファージfdの遺伝子IIIへの融合をもたらした。次いで、エレクトロポレーションによってベクターをイー・コリ(例えば、TG1系統)中に形質転換して、対応するファージミドライブラリーを得た。

【0078】

s c F v-遺伝子3融合を展示するファージライブリーやプラスミドライブリーやの各々をM13K07ヘルパーファージで感染させることによって調製し(R.H. Jackson(上掲))、個々に、プラスチック上にコートした組換えF蛋白質に対する2ラウンドのパンニングに付した。第1ラウンドにおいて、2.5mLリン酸緩衝化セーライン(PBS)/2%MarvalTM脱脂乾燥ミルク中における10⁻¹ファージを90分間、5μg/mlのF蛋白質でコートした試験管中でインキュベートし(P. Tsuら、J. Immunol. 157: 772-780(1996)に記載されている)、次いで、10xPBS/0.05%Tween20で1回洗浄し、10xPBS単独で2回目の洗浄を行った。結合したファージを10mMトリエチルアミンで溶出し、溶出液を1MTris-HCl、pH7.4で中和した。溶出したファージを増幅し、コーティングするためのF蛋白質の濃度が2μg/mlであり、洗浄バッファーが20xPBSを含有したことを除き、第2ラウンドの同様のパンニングに付した。

【0079】

イー・コリを溶出したファージで感染させ、各出発ライブルー由来の96個のコロニーをヘルパーファージで重複感染させ、F蛋白質結合活性についてスクリーンした。たった4個の陽性クローニングが2個のIgMライブルーから得られたが、一方、41個の陽性クローニングがIgGライブルーについて観察された。部分配列分析によって、全クローニングが3つの異なるH鎖の1つを有した。6個のクローニングのHおよびL鎖V領域の完全な配列は、全て、IgGライブルーから得られた。

【0080】

これらの6個のクローニングの各々の滴定濃度(titered)ファージストックの連続希釈液を組換えF蛋白質およびRSV感染細胞ライゼートへの結合についてELISAによって試験した。全てがF蛋白質への結合を示し、Gλ-1と呼ばれるファージが最も良好な活性を示した。しかしながら、Gλ-1および3個の他のクローニングは、RSVライゼートへの結合をほとんど示さなかった。

【0081】

3つのクローニング: Gλ-1、Gλ-3(ライゼート結合陽性)、およびGκ-

1 (ライゼート結合陰性) (ここに、「 κ 」および「 λ 」はL鎖のクラスを示す) は、F蛋白質特異的中和モノクローナル抗体によるそれらの結合の競合およびウイルス感染を阻害するそれらの能力についてさらに特徴付けられた。1992年3月19日に公開された国際特許出願公開第WO 92/04381号、および1993年10月14日に公開された国際特許出願公開第WO 93/20210号に記載された中和mAb RSV19およびB4は、F蛋白質上の別個のエピトープを認識する。G κ -1は、両方の抗体によって強く阻害された。G λ -1は、B4のみによって有意に阻害された。G κ -3は、いずれの抗体によっても阻害されなかった (G λ -1だけについて示される; 図1Aおよび1B参照)。最初のアッセイにおいて (表I、実験1-3)、3個のクローン全てがイン・ビトロで中和活性を示し、G λ -1は最も強力であった (図2、実験2のグラフ)が、一方、scFvを展示していない対照野性型ファージ (M13K07) は効果がなかった。

【0082】

中和がエピトープに関係なくウイルスのファージコーティングだけに起因しうるという可能性に注目するために、非中和Fab5-16のファージ調製物を同じアッセイにおいて試験した。4つのアッセイのうち3つにおいて、該調製物もまた良好な中和活性を示し、これらのアッセイのうち2つにおいて対照ファージと同様であった (表I、実験4-7)。Fab5-16および対照M13K07ファージの両方による可変中和のこの混乱する結果により、ウイルス中和研究は結論に達しなかった。

【0083】

【表1】

表 I

ファージ試 料	ウイルス中和 ($IC_{50} \times 10^{-7}$) ¹ (aru または kru/ml) ²						
実験番号							
	1	2	3	4	5	6	7
G _K -1 a	1,600		<300				
b				<10	<7		
G _λ -1 a		80	<300				
b				8.1	11		
c						120	
G _λ -3 a		900	<300	180			
b					<7	10	
c							730
M13K07a			>10 ⁵	>10 ⁵		>5,000	
b					+全希釈	+全希釈	>10 ⁴
Fab 5-19a				>10 ⁵	40	180	
b							3.5

凡例 :

1 M. J. Cannon, J. Virol. Meth., 16:293-301によるアッセイ。100感染中心／ウェルのウイルスを示されたファージの希釈液と一緒に1時間インキュベートし、次いで、感受性細胞に3時間添加した。ウイルス／ファージ溶液を吸引し、新しい培地と交換し、細胞を一晩インキュベートした後、ウイルス感染細胞についてペルオキシダーゼ染色した。

2 aru = アンピシリソ耐性単位、ファージミド含有粒子の測定単位。

kru = カナマイシン耐性単位、ファージゲノムを含有する粒子の測定単位
(M13K07対照の場合のみ)

【0084】

これらの結果を考えると、ファージストック対既知の濃度の抗体蛋白質に依存

する全てのアッセイによってより不明瞭になったが、（1）F-蛋白質へのその見かけのより良好な結合、（2）B4抗体による結合のその選択的阻害および（3）ウイルス中和アッセイにおけるバックグラウンドを超えるその示唆される活性に基づいて、Gλ-1が強力な中和抗体のための最も可能性のある候補として選択された。

【0085】

実施例2：Gλ-1 scFVのmA bバージョンAへの変換

Gλ-1のVHおよびVL領域のDNAおよびコードされる蛋白質配列を各々、図3（配列番号1および2）および4（配列番号3および4）に示す。哺乳動物細胞における発現の場合、Gλ-1プラスミド由来のH鎖可変領域およびL鎖可変領域を抗体鎖の発現がサイトメガロウイルスプロモーター（CMV）プロモーターによって制御されるプラスミドpCDN（Nambi, A.ら、Mol. Cell. Bioc hem., 131: 75-86 (1994)）の誘導体中にクローニングした。プラスミドpCD-HC68Bは、全長H鎖を発現するために用いられ、プラスミドpCN-HuL-Cは全長L鎖の発現に用いられる。

【0086】

最初の構築物において、アミノ末端の配列における変化は、プラスミドGλ-1由来のL鎖およびH鎖可変領域をクローニングするために用いられるPCRプライマーによって導入された。これらの構築物において、HおよびL鎖両方のペプチドシグナル配列は、キャンパスL鎖から誘導される（M.J. Pageら、Biotechnology 9: 64-68 (1991)）。可変領域のアミノ末端および枠組み構造4のためのプライマーを用いて、Gλ-1のH鎖をGλ-1ファージミドDNAからPCR増幅した。得られたPCRフラグメントをXba I（アミノ末端プライマーによって導入された部位）およびBstEII（枠組み構造4における天然の部位）で切断し、中間ベクター、F4HCV中にXba I/BstEII部位にてクローニングした。

【0087】

該クローニングは、Gλ-1の可変領域を別の抗-RSV H鎖194-F4の不变領域（ヒトハイブリドーマからSmithKline Beechamでクローニングされた）

上に連結した。該中間体クローンをX h o I およびB s p 1 2 0 I で切断し、p CD-HC68B中における同じ部位に導入した。X h o I 部位はP C Rプライマーによってアミノ末端に導入され、p CD-HC68B中に同じ部位でクローン化した場合、キャンパスリーダー配列がフレーム中において先に位置する。B s p 1 2 0 I 部位は天然であり、C_{II-1}ドメインの開始における高く保存された部位であり、p CD-HC68B中に同じ部位でクローン化した場合、C_{II-1}の残りの配列からヒトI g G₁のC_{II-3}領域と一緒にフレーム内にある。得られた構築物、G_{λ-1}A p c d (図8A-8F (配列番号13))において、キャンパスリーダーのすぐ後のアミノ酸はE V Q L L E (配列番号17) であり、ここに、残基L EはX h o I クローニング部位のヌクレオチド配列によってコードされている。

【0088】

可変領域のアミノ末端および枠組み構造4のためのプライマーを用いて、G_{λ-1}のL鎖をG_{λ-1}ファージミドDNAからP C R増幅した。得られたP C RフラグメントをS a c I (アミノ末端プライマーによって導入された部位) およびA v r I I (枠組み構造4における天然部位) で切断し、S a c I / A v r I I 部位で4 3 - 1 p c n 中にクローン化した。該クローニングは、G_{λ-1}の可変領域をフレーム内で別の抗-R S VラムダL鎖4 3 (P. Tsuiら、J. Immunol., 157: 772-780 (1996)) の不变領域 (ヒト脾臓から単離したRNAから由来のコンビナトリアルライブラリーからSmithKline Beechamでクローン化された) 上に連結した。P C Rプライマーによってアミノ末端にS a c I 部位を導入し、同じ部位で4 3 p c n 中にクローン化した場合、フレーム内でキャンパスリーダー配列が先に位置する。したがって、成熟L鎖の最初の2つのアミノ鎖が削除される。得られた構築物、G_{λ-1}A p c n (図9A-9E (配列番号14))において、リーダーの直後の最初の2つのアミノ酸はE Lであり、ここに、残基E LはS a c I クローニング部位のヌクレオチド配列によってコードされている。

プラスミドG_{λ-1}A p c d およびG_{λ-1}A p c n のヌクレオチド配列を各々、図8A-8F (配列番号13) および9A-9E (配列番号14) に示す。ベクターの該セットを用いて、C O S細胞およびC H O細胞中において抗体G_λ

– 1 Aを生産した。

【0089】

実施例3：補正したG λ –1 HおよびL鎖のクローニング

1本鎖Fv (scFv) フォーマット由来のG λ –1 H鎖の可変領域の全長フォーマット中へのクローニングにおいて、クローニング目的のために、アミノ末端の5番目のアミノ酸をValからLeuへ変化させた。この変化を補正するために、PCRプライマーがpCD中にクローン化したG λ –1 H鎖のアミノ末端のために設計され、それは、5番目のアミノ酸をValに戻した。補正は、補正プライマーおよび外部5'および3'プライマーとして各々、CMVプロモーターおよびC_{H-2}不变領域内の配列にアニールするプライマーを用いるPCRオーバーラップ技術によって導入された。最終的なPCR産物を制限酵素、EcoRIおよびBsp120Iで消化し、G λ –1 Apcdベクター中に同じ部位でクローン化してG λ –1 Bpcdを作成した。

【0090】

最終的な構築物を配列決定して、H鎖のアミノ末端がEVQLLE (配列番号17) からEVQLVE (配列番号18) に補正されたことを証明した (図6参照)。補正されたH鎖、G λ –1 Bのコーディング領域のヌクレオチド配列を図10A–10Bに示す (配列番号15)。

scFv フォーマットから全長フォーマットへのG λ –1 L鎖の可変領域のクローニングにおいて、クローニング目的でアミノ末端に変化を導入した。詳細には、L鎖の最初の2つのアミノ酸 (GlnおよびSer) を削除し、3番目のアミノ鎖をValからGluへ変化させた。これらの変化を補正するために、pCN中にクローン化されたG λ –1 L鎖のアミノ末端のためにPCRプライマーを設計し、それは、2つの欠失したアミノ酸 (GlnおよびSer) を元の場所に置き、第3のアミノ酸をValに戻した。補正は、補正プライマーおよび外部5'および3'プライマーとして各々、CMVプロモーターおよび不变領域内の配列にアニールするプライマーを用いるPCRオーバーラップ技術によって導入された。最終的なPCR産物を制限酵素、EcoRIおよびAvrIIで消化し、G λ –1 Apcnベクター中に同じ部位でクローン化して、G λ –1 Bpcn

を作成した。

【0091】

最終的な構築物を配列決定して、L鎖のアミノ末端が—E LからQ S V L（配列番号10のアミノ酸1-4）へ補正されたことを証明した。

補正されたL鎖のコーディング領域のスクレオチド配列、G λ-1 Bを図11に示す（配列番号16）。該ベクターG λ-1 B p c nをG λ-1 B p c dと一緒に用いて、COS細胞およびCHO細胞中において抗体G λ-1 Bを生産した。

【0092】

実施例4：哺乳動物細胞におけるG λ-1 mABの生産

最初の特徴付けのために、各バージョンのmAb構築物、G λ-1 A HおよびL鎖、G λ-1 B HおよびL鎖をCOS細胞中において基本的にCurrent Protocols in Molecular Biology, eds F. N. Ausubelら、1988, John Wiley & Sons, vol. 1, section 9.1に記載のように発現させた。トランスフェクション後1日目に、培養増殖培地を血清不含培地（SmithKline Beecham）で置き換え、それを3日目に交換した。公共入手可能な培地、ITSTM Premix、インスリン、トランスフェリン、セレニウム混合物（Collaborative Research, Bedford, MA）および1mg/mlウシ血清アルブミン（BSA）を捕捉したDME Mを用いて、同様の満足のいく結果が得られる。

【0093】

mAbは、3日および5日目の順化培地から標準的なプロテインAアフィニティーカロマトグラフィー法（例えば、Protocols in Molecular Biologyに記載されている）によって、例えば、Prosep Aアフィニティー樹脂（Bioprocessing Ltd., UK）を用いて調製された。

より大量のG λ-1 B mAB（100-200mg）を生産するために、ベクターを有標のCHO細胞系中に導入した。しかしながら、以前に記載されたようにdhfr⁻CHO細胞を用いて同様の結果が得られるであろう（P. Hensleyら、J. Biol. Chem., 269: 23949-23958 (1994)）。簡単に言えば、全30μgの線状化プラスミドDNA（H鎖およびL鎖ベクターのAまたはBセットの各1

5 μ g) を 1×10^7 細胞中にエレクトロポレートした。細胞を最初に、96 ウェルプレート中においてスクレオシド不含培地中で選択する。3~4 週間後、増殖陽性ウェル由来の培地を E L I S A アッセイを用いてヒト免疫グロブリンについてスクリーンする。最も高く発現するコロニーをトランスフェクトしたベクターの増幅について高濃度のメトトレキサート中において広げ、選択する。プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー (プロテイン A セファロース、Pharmacia)、次いで、サイズ排除クロマトグラフィー (Superdex 200, Pharmacia) を用いる標準的な手法によって抗体を順化培地から精製する。

【0094】

溶出した抗体の濃度および抗原結合活性を E L I S A によって測定する。抗体含有フラクションをプールし、サイズ排除クロマトグラフィーによってさらに精製する。いずれかのかかる抗体について予想されるとおり、S D S - P A G E によって、優勢な蛋白質生産物は、非還元条件下で約 150 k d に移動し、50 および 25 k d の 2 つのバンドが還元条件下で現れた。C H O 細胞において生産された抗体の場合、S D S - P A G E による判断によると純度は > 90% であり、濃度はアミノ酸分析によって正確に決定された。

【0095】

実施例 5 : G λ - 1 m A B の組換え F 蛋白質への結合

G λ - 1 m A B の組換え F 蛋白質への結合は、標準的な固相 E L I S A において測定された。P B S p H 7.0 中で希釈した抗原をポリスチレン丸底ミクロプレート (Dynatech, Immunolon II) 上に 18 時間吸着させた。次いで、ウェルを吸引し、1% T w e e n 2 0 を含有する P B S 中における 0.5% 煮沸カゼイソ (B C) (P B S / 0.05% B C) で 2 時間ブロックした。抗体 (50 μ l / ウェル) を 0.025% T w e e n 2 0 を含有する P B S / 0.5% B C 中において種々の濃度に希釈し、抗原被覆ウェル中で 1 時間インキュベートした。プレートを 0.05% T w e e n 2 0 を含有する P B S で Titertek 320 ミクロプレート洗浄機を用いて 3 回洗浄し、次いで、1 : 5000 希釈した H R P - 標識化プロテイン A / G (50 μ l) を添加した。3 回洗浄後、T M B 1 u e 基質 (T S I, #TM102) を加え、プレートをさらに 15 分間インキュベートした。1

NH_2SO_4 の添加によって反応を止め、Bioteck ELISAリーダーを用いて吸光度を 450 nm で記録した。

【0096】

$\text{G}\lambda-1\text{mAB}$ の抗原結合エピトープを競合ELISAにおいて試験した。 $\text{G}\lambda-1\text{mAB}$ は、高濃度の RSMU19 または B4、2 つの強力な中和 mAb (Tempestら、Biotech., 9: 266-271 (1991); Kennedyら、J. Gen. Virol., 69: 3023-3032 (1988)) と混合し、F 蛋白質被覆ウェルに加えた。Abrizaら、J. Gen. Virol., 73: 2225-2234 (1992)において以前に記載されたように、mAb RSMU19 および B4 によって認識されるエピトープ領域は互いに全く別個である。競合研究において使用された $\text{G}\lambda-1\text{mAB}$ の濃度は、F 抗原に対して最大 90% の結合を与えるように予め決定された。他の mAb の存在下での $\text{G}\lambda-1\text{mAB}$ の結合は、HRP 標識化ヤギ抗ヒト IgG を用いて検出された。反応は上記のように開始した。

【0097】

$\text{G}\lambda-1\text{mAB}$ は、ELISA によって組換え F (rF) 蛋白質への強力な結合を明らかにした (mAb B に対する EC₅₀ = 2.6 ng/ml)。 $\text{G}\lambda-1\text{mAB}$ の rF 蛋白質への結合は、抗原認識に不可欠な F 蛋白質アミノ酸が配列番号 20 のアミノ酸 268、272 および 275 である mAb B4 によって阻害された。 $\text{G}\lambda-1\text{mAB}$ の rF 蛋白質への結合は、配列番号 20 の F 蛋白質アミノ酸 429 が抗原認識に不可欠である mAb RSMU19 によって阻害されなかった。これらの結果は、F 蛋白質 (配列番号 20) のアミノ酸 255-275 の領域における残基が $\text{G}\lambda-1\text{mAB}$ 認識に不可欠であることを示す。

【0098】

実施例 6 : $\text{G}\lambda-1\text{mAB}$ のイン・ビトロ融合-阻害活性

$\text{G}\lambda-1\text{mAB}$ のウイルス誘導性細胞融合を阻害する能力は、イン・ビトロでの微量中和アッセイ (Beelerら、J. Virol., 63: 2941-2950 (1989)) の修飾を用いて決定された。該アッセイにおいて、50 μl の RSLong 系統ウイルス (10-100 TCID₅₀/ウェル (American Type Culture Collection ATCC VR-26)) を 2% ウシ胎児血清 (FCS) を含有する最少必須培地 (MEM)

中において、37°C、5%CO₂で4時間0.1ml VERO細胞(5 x 10³/ウェル)(ATCC CCL-81)と混合した。次いで、mABの連続的な2倍希釈液(4連)(50μl)をウイルス感染細胞を含有するウェルに加えた。対照培養物は、ウイルスのみでインキュベートした細胞(陽性ウイルス対照)または培地のみでインキュベートした細胞を含有した。

【0099】

培養物を37°Cで5%CO₂中において6日間インキュベートし、そのとき、ウイルス対照ウェル中の細胞病理学的效果(CPE)は>90%であった。細胞病理学的效果の顕微鏡試験は、ELISAによって確認された。培地を培養物から吸引し、50μlの0.6%H₂O₂を含有する90%メタノールで置換した。10分後、固定液を吸引し、プレートを一晩風乾した。1μg/mlのビオチン化RSCHB4(ウシB4mAbのヒトFc誘導体(SmithKline Beecham))、次いで、1:10000希釈したHRP-標識化ストレプトアビジン(Boehringer-Mannheim)を用いて、ウイルス性抗原を固定した培養物中において検出した。TMB 1ueを用いて反応を開始し、1N H₂SO₄の添加によって止めた。450nmの吸光度を測定した(O.D. ₄₅₀)。

【0100】

融合-阻害力値は、ウイルス対照と比べてELISAシグナルにおいて50%減少を引き起こした抗体濃度(ED₅₀)として定義付された。標準的なウイルス滴定によるELISAにおいて作成された曲線に基づいて、O.D. ₄₅₀における50%減少はウイルス力値における≥90%減少に相当した。50%点の計算は、用量滴定の回帰分析に基づいた。

Gλ-1mABは、A型RS Long系統ウイルスに対する強力なイン・ビトロ融合-阻害活性を明らかにした(mAB BのED₅₀は、0.51±0.38μg/ml)。該イン・ビトロ融合-阻害アッセイにおいて、Gλ-1mA B Bは、比較アッセイにおけるヒト化mAB RSHZ19(0.4-3.0μg/mlのED₅₀)(Wydeら、Pediatr. Res., 38(4):543-550)より活性であった。

【0101】

実施例7: G λ -1 mAB Bのイン・ビボ活性: Ba 1 b/cマウスモデルにおける予防および治療

ヒトRSVのA2系統の 10^5 PFUの鼻腔内感染の24時間前(予防)または4日後(治療)のいずれかに、0.06 mg/kg～5 mg/kg範囲のG λ -1 mAB BをBa 1 b/cマウス(5/群)に腹腔内接種した。マウスを感染5日後に殺した。肺を採取し、ホモジナイズしてウイルス力値を決定した。

ウイルスは、予防的または治療的に ≥ 1.25 mg/kg G λ -1 mAB Bで予防的処理を行ったマウスの肺において検出されなかった。下記の表I I を参照のこと。有意なウイルスのクリアランス(2-3 log₁₀)もまた、0.31 mg/kg G λ -1 mAB Bを予防的または治療的に受けた動物において達成された。

【0102】

【表2】

表I I : Ba 1 b/cマウスにおけるG λ -1 mAB B予防および治療

処理	用量 (mg/kg)	肺ウイルス力値 (\log_{10} /g 肺)	
		予防	治療
G λ -1 mAB B	5	<1.7	<1.7
	1.25	<1.7	<1.7
	0.31	1.8 ± 0.3	2.9 ± 0.4
	0.06	4.3 ± 0.7	4.5 ± 0.3
PBS	-	4.8 ± 0.7	4.7 ± 0.2

【0103】

G λ -1 mABは、AおよびB型の両方の幅広い範囲の天然RSV単離株に対するイン・ビトロにおける強力な抗ウイルス活性を有し、動物モデルにおいて

イン・ビボで予防的および治療的効力を示す。したがって、G λ-1 m A Bは、ヒトにおける治療的、予防的および診断的適用の候補である。

本明細書に記載された発明を考慮して、本発明の多くの修飾および変更が当業者によって施されうる。かかる修飾は、本発明の明細書および請求の範囲によつて包含されると確信する。上記の全ての引用文献は、出典明示により本明細書の一部とされる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: SmithKline Beecham, PLC

(ii) TITLE OF INVENTION: Human Monoclonal Antibody

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 21

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: SmithKline Beecham Corporation
(B) STREET: 709 Swedeland Road
(C) CITY: King of Prussia
(D) STATE: PA
(E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 19406-2799

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: GB
(B) FILING DATE:
(C) CLASSIFICATION:

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: King, William T.
(B) REGISTRATION NUMBER: 30,954
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: #

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: 610-270-4800
(B) TELEFAX: 610-270-4026

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 336 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: double
(D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 1..336

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

CAG TCT GTG TTG ACG CAG CCG CCC TCA GTC TCT GCG GCC CCA GGA CAG
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

48

AAG GTC ACC ATC TCC TGC ACT GGG AGC AGC TCC AAC CTC GGG CCA GGT

96

Lys Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Leu Gly Ala Gly	20	25	30	
TAT GAT GTT CAC TGG TAC CGG CAA CTT CCA GGG ACA GCC CCC AAA CTC	35	40	45	144
Tyr Asp Val His Trp Tyr Arg Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu				
CTC ATC TAT GAT AAC AAC AAT CGG CCC TCA GGG GTC CCT GAC CGA TTC	50	55	60	192
Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe				
TCT GGC TCC AAG TCT GGC CCC TCA GCC TCC CTG GCC ATC TCT GGG CTC	65	70	75	240
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Pro Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu				
CAG GCT GAG GAT GAG GCT GAT TAT TAC TGC CAG TCC TAT GAC AGC AGC	85	90	95	288
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser				
CTG AAT GGT TAT GTC TTC GGA ACT GGG ACC CAG CTC ACC GTC CTA GGT	100	105	110	336
Leu Asn Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly				

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 112 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln	1	5	10	15
Lys Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Leu Gly Ala Gly	20	25	30	
Tyr Asp Val His Trp Tyr Arg Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu	35	40	45	
Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe	50	55	60	
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Pro Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu	65	70	75	80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser	85	90	95	
Leu Asn Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly	100	105	110	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 357 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: double

(D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 1..357

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG	48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
TCC CTG AGA CTC TCC TGC GCA GCC TCT GGA GTC TCC CTC AGT GGA TAC	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Ser Gly Tyr	
20 25 30	
AAG ATG AAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAA TGG GTC	144
Lys Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
TCT TCC ATT ACT GGT ATG AGT AAT TAC ATA CAC TAC TCA GAC TCA GTG	192
Ser Ser Ile Thr Gly Met Ser Asn Tyr Ile His Tyr Ser Asp Ser Val	
50 55 60	
AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC ATG AAC TCA CTG TAT	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Met Asn Ser Leu Tyr	
65 70 75 80	
CTG CAA ATG AAC AGC CTG ACA GCC GAG GAC ACG GGT GTT TAT TAT TGT	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
GCG ACA CAA CCG GGG GAG CTG GCG CCT TTT GAC CAT TGG GGC CAG GGA	336
Ala Thr Gln Pro Gly Glu Leu Ala Pro Phe Asp His Trp Gly Gln Gly	
100 105 110	
ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA	357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
115	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 119 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Ser Gly Tyr	
20 25 30	
Lys Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	

35	40	45
Ser Ser Ile Thr Gly Met Ser Asn Tyr Ile His Tyr Ser Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Met Asn Ser Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Thr Gln Pro Gly Glu Leu Ala Pro Phe Asp His Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 119 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (C) STRANDEDNESS:
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

1	5	10
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
20	25	30
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu Ser Gly Tyr		
35	40	45
Lys Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Met Asn Ser Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Thr Gln Pro Gly Glu Leu Ala Pro Phe Asp His Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 98 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (C) STRANDEDNESS:
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 138 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS:
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu
35 40 45
Ser Gly Tyr Lys Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ser Ser Ile Thr Gly Met Ser Asn Tyr Ile His Tyr Ser
65 70 75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Met Asn
85 90 95
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Val

100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Thr Gln Pro Gly Glu Leu Ala Pro Phe Asp His Trp		
115	120	125
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
130	135	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 138 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS:
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly			
1	5	10	15
Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln			
20		25	30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ser Leu			
35	40	45	
Ser Gly Tyr Lys Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
50	55	60	
Glu Trp Val Ser Ser Ile Thr Gly Met Ser Asn Tyr Ile His Tyr Ser			
65	70	75	80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Met Asn			
85	90	95	
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Val			
100	105	110	
Tyr Tyr Cys Ala Thr Gln Pro Gly Glu Leu Ala Pro Phe Asp His Trp			
115	120	125	
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
130	135		

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 111 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS:
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Leu Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Arg Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Pro Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

Leu Asn Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
100 105 110

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 90 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS:
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 128 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS:
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly
20 25 30
Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala
35 40 45
Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys
50 55 60
Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg
65 70 75 80
Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly
85 90 95
Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser
100 105 110
Ser Leu Asn Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
115 120 125

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 130 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS:
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala
20 25 30
Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile
35 40 45
Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala
50 55 60
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile
85									90					95	
Thr	Gly	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Tyr
100									105				110		
Asp	Ser	Ser	Leu	Asn	Gly	Tyr	Val	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Gln	Leu	Thr
115								120				125			
Val	Leu														
130															

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 6281 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

GACGTCGCGG	CCGCTCTAGG	CCTCCAAAAA	AGCCTCTCA	CTACTTCTGG	AATAGCTCAG	60
ACGCCGAGGC	GGCCTCGGCC	TCTGCATAAA	TAAAAAAAAT	TAGTCAGCCA	TGCATGGGGC	120
GGAGAACATGGG	CGGAACTGGG	CGGAGTTAGG	GGCGGGATGG	GGGGAGTTAG	GGGCGGGACT	180
ATGGTTGCTG	ACTAATTGAG	ATGCATGCTT	TGCATACTTC	TGCCTGCTGG	GGAGCCTGGG	240
GACTTTCCAC	ACCTGGTTGC	TGACTAATTG	ACATGCATGC	TTTGCATACT	TGTGCTGCT	300
GGGGAGCCTG	GGGACTTTCC	ACACCCCTAAC	TGACACACAT	TCCACAGAAAT	TAATTCCCGG	360
GGATCGATCC	CTCGACGTAC	GACTAGTTAT	TAATAGTAAT	CAATTACGGG	GTCATTAGTT	420
CATAGCCCAT	ATATGGAGTT	CCCGGTTACA	TAACTTACGG	TAAATGGCCC	GCCTGGCTGA	480
CCGCCCAACG	ACCCCCGCC	ATTGACGTCA	ATAATGACGT	ATGTTCCCAT	AGTAACGCCA	540
ATAGGGACTT	TCCATTGACG	TCAATGGGTG	GACTATTAC	GGTAAACTGC	CCACTTGGCA	600
GTACATCAAG	TGTATCATAT	GCCAAAGTACG	CCCCCTATTTG	ACGTCAATGA	CGGTAAATGG	660
CCCGCCTGGC	ATTATGCCCA	GTACATGACC	TTATGGGACT	TTCCTACTTG	GCAGTACATC	720
TACGTATTAG	TCATCGCTAT	TACCATGGTG	ATGCGGTTTT	GGCAGTACAT	CAATGGCGT	780
GGATAGCGGT	TTGACTCAGC	GGGATTTCCA	AGTCTCCACC	CCATTGACGT	CAATGGGAGT	840
TTGTTTTGGC	ACCAAAATCA	ACGGGACTTT	CCAAAATGTC	GTAACAACTC	GGCCCCATTG	900
ACGCAAATGG	GCGGTAGGCG	TGTACGGTGG	GAGGTCTATA	TAAGCAGAGC	TGGGTACGTG	960
AACCGTCAGA	TCGCCTGGAG	ACGCCATCGA	ATTCTGAGCA	CACAGGACCT	CACCATGGGA	1020
TGGAGCTGTA	TCATCCTCTT	CTTGGTAGCA	ACAGCTACAG	GTGTCCACTC	CGAGGTCCAA	1080

CTGCTCGAGT	CTGGGGGAGG	CTTGGTACAG	CCTGGGGGT	CCCTGAGACT	CTCCTGCGCA	1140
GCCTCTGGAG	TCTCCCTCAG	TGGATAACAAG	ATGAACTGGG	TCCGCCAGGC	TCCAGGGAAAG	1200
GGGCTGGAAT	GGGTCTCTTC	CATTACTGGT	ATGAGTAATT	ACATACACTA	CTCAGACTCA	1260
GTGAAGGGCC	GATTCACCAT	CTCCAGACAC	AACGCCATGA	ACTCACTGTA	TCTGCAAATG	1320
AACAGGCTGA	CAGCCGAGGA	CACGGGTGTT	TATTATTGTG	CGACACAAACC	GGGGGAGCTG	1380
GCAGCTTTTG	ACCATTGGGG	CCAGGGAAACC	CTGGTCACCG	TCTCCTCAGC	CTCCACCAAG	1440
GGCCCATCGG	TCTTCCCCCT	GGCACCCCTCC	TCCAAGAGCA	CCTCTGGGGG	CACAGCGGCC	1500
CTGGGCTGCC	TGGTCAAGGA	CTACTTCCCC	GAACCGGTGA	CGGTGTCGTG	GAACTCAGGC	1560
GCCTGACCA	GCGGCGTGCA	CACCTTCCCC	GCTGTCCTAC	AGTCCTCAGG	ACTCTACTCC	1620
CTCAGCAGCG	TGGTGACCGT	GCCTCCAGC	AGCTTGGGCA	CCCAGACCTA	CATCTGCAAC	1680
CTGAATCACA	AGCCCAGCAA	CACCAAGGTG	GACAAGAAAG	TTGAGCCCAA	ATCTTGTGAC	1740
AAAACTCACA	CATGCCACC	GTGCCCAGCA	CCTGAACCTC	TGGGGGGACC	GTCAGTCITC	1800
CTCTTCCCCC	CAAAACCCAA	GGACACCCCTC	ATGATCTCCC	GGACCCCTGA	GGTCACATGC	1860
GTGGTGGTGG	ACGTGAGCCA	CGAAGACCCCT	GAGGTCAAGT	TCAACTGGTA	CGTGGACGGC	1920
GTGGAGGTCC	ATAATGCCAA	GACAAAGCCG	CGGGAGGGAGC	AGTACAACAG	CACGTACCGG	1980
GTGGTCAGCG	TCCTCACCGT	CCTGCACCAAG	GAATGGCTGA	ATGGCAAGGA	GTACAAGTGC	2040
AAGGTCTCCA	ACAAAGCCCT	CCCAGCCCCC	ATCGAGAAAA	CCATCTCCAA	AGCCAAAGGG	2100
CAGCCCCGAG	AACCACAGGT	GTACACCCCTG	CCCCCATCCC	GGGATGAGCT	GACCAAGAAC	2160
CAGGTCAGCC	TGACCTGCCT	GGTCAAAGGC	TTCTATCCCA	GCGACATCGC	CGTGGAGTGG	2220
GAGAGCAATG	GGCAGCCGGA	GAACAACTAC	AAGACCACGC	CTCCCCTGCT	GGACTCCGAC	2280
GGCTCCPTCT	TCCTCTACAG	CAAGCTCACC	GTGGACAAGA	GCAGGTGGCA	GCAGGGGAAC	2340
GTCTTCTCAT	GCTCCGTGAT	GCATGAGGCT	CTGCACAAACC	ACTACACGCA	GAAGAGCCTC	2400
TCCCTGTCTC	CGGGTAAATG	ATAGATATCT	ACGTATGATC	AGCCTCGACT	GTGCCCTCTA	2460
GTTGCCAGCC	ATCTGTTGTT	TGCCCTCCC	CCGTGCCCTTC	CTTGACCCCTG	GAAGGTGCCA	2520
CTCCCCACTGT	CCTTCTCAA	AAAATGAGG	AAATTGCATC	GCATTGTCTG	AGTAGGTGTC	2580
ATTCTATTCT	GGGGGTGGG	GTGGGGCAGG	ACAGCAAGGG	GGAGGATTGG	GAAGACAATA	2640
GCAGGCATGC	TGGGGATGCC	GTGGGCTCTA	TGGAACCAGC	TGGGGCTCGA	CAGCGCTGGA	2700
TCTCCCGATC	CCCAGCTTGT	CTTCTCAATT	TCTTATTGTC	ATAATGAGAA	AAAAAGGAAA	2760
ATTAATTTTA	ACACCAATT	AGTAGTTGAT	TGAGCAAATG	CGTTGCCAAA	AAGGATGCTT	2820
TAGAGACAGT	GTTCTCTGCA	CAGATAAGGA	CAAACATTAT	TCAGAGGGAG	TACCCAGAGC	2880
TGAGACTCCT	AAGCCAGTGA	GTGGCACAGC	ATTCTAGGGA	GAAATATGCT	TGTCATCACC	2940
GAAGCCTGAT	TCCGTAGAGC	CACACCTTGG	TAAGGGCCAA	TCTGCTCACA	CAGGATAGAG	3000

AGGGCAGGAG CCAGGGCAGA GCATATAAGG TGAGGTAGGA TCAGTTGCTC CTCACATTTG	3060
CTTCTGACAT AGTTGTGTTG GGAGCTTGGA TAGCTGGAC AGCTCAGGGC TGCGATTTCG	3120
CGCCAAACTT GACGGCAATC CTAGCGTGAA GGCTGGTAGG ATTTTATCCC CGCTGCCATC	3180
ATGGTTCGAC CATTGAAC TGACATCGGCC GTGTCCAAA ATATGGGGAT TGGCAAGAAC	3240
GGAGACCTAC CCTGGCTCC GCTCAGGAAC GAGTCAACT ACCTCCAAAG AATGACCACA	3300
ACCTCTTCAG TGGAAAGGTAAC AGAGAATCTG GTGATTATGG GTAGGAAAAC CTGGTTCTCC	3360
ATTCCCTGAGA AGAATCGACC TTTAAAGGAC AGAATTAATA TAGTCTCAG TAGAGAACTC	3420
AAAGAACAC CACGAGGAGC TCATTTCTT GCCAAAAGTT TGGATGATGC CTTAAGACTT	3480
ATTGAACAAAC CGGAATTGGC AAGTAAAGTA GACATGGTTT GGATAGTCGG AGGCAGTTCT	3540
GTTCCTACAG AAGCCATGAA TCAACCAGGC CACCTTAGAC TCTTGTGAC AAGGATCATG	3600
CAGGAATTG AAAGTACAC GTTTTTCCCA GAAATTGATT TGGGAAATA TAAACTTCTC	3660
CCAGAAATACC CAGGCCCTCT CTCTGAGGTC CAGGAGGAAA AAGGCATCAA GTATAAGTTT	3720
GAAGTCTACG AGAAGAAAGA CTAACAGGAA GATGCTTCA AGTTCTCTGC TCCCCTCCTA	3780
AAGCTATGCA TTTTTATAAG ACCATGGGAC TTTTGCTGGC TTTAGATCAG CCTCGACTGT	3840
GCCTCTAGT TGCCACCCAT CTGTTGTTG CCCCTCCCCC GTCCCTCCCT TGACCCCTGGA	3900
AGGTGCCACT CCCACTGTCC TTTCTAATA AAATGAGGAA ATTGCATGCG ATTGTCTGAG	3960
TAGGTGTCAT TCTATTCTGG GGGGTGGGTT GGGGCAGGAC AGCAAGGGGG AGGATTGGGA	4020
AGACAATAGC AGGCATGCTG GGGATGCGGT GGGCTCTATG GAACCAGCTG GGGCTCGATC	4080
GAGTGTATGA CTGCGGCCGC GATCCCGTCG AGAGCTTGGC GTAATCATGG TCATAGCTGT	4140
TTCCTGTGTG AAATTGTTAT CCAGTCACAA TTCCACACAA CATACTGAGCC GGAAGCATAAA	4200
AGTGTAAAGC CTGGCGTGCC TAATGAGTGA GCTAACTCAC ATTAATTGCG TTGCGCTCAC	4260
TGCCCCCTTT CCAGTCGGGA AACCTGTCGT GCCAGCTGCA TTAATGAATC GGCAACGCG	4320
CGGGGAGAGG CGGTTTGCCT ATTGGGCGCT CTTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTGC	4380
GCTCGGTGCT TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT CAGCTCAGTC AAAGGCGGTAA ATACGGTTAT	4440
CCACAGAAATC AGGGGATAAC GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA	4500
GGAACCGTAA AAAGGCCCGG TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GGTCCGGCCC CCTGACGAGC	4560
ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GGCAGAAACCC GACACGGACT TAAAGATACC	4620
AGGCCTTCC CCTCTGCAAGC TCCCTCGTGC GCTCTCTGT TCCGACCTG CCGCTTACCG	4680
GATAACCTGTC CGGCTTCTC CCTTCGGGAA GCGTGGCGT TTCTCAATGC TCACGCTGTA	4740
GGTATCTCAG TTGGGTGAG GTCGTTGCGT CCAAGCTGGG CTGCTGCGAC GAACCCCCCG	4800
TTCAGCCCCGA CCTCTGCGCC TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGACTCCAAC CCGGTAAGAC	4860

ACGACTTATC	CCCACTGGCA	GCAGCCACTG	CTAACAGGAT	TAGCAGAGCG	AGGTATGTAG	4920
CCGGTGTCTAC	AGAGTTCTTG	AACTGGTGGC	CTAACTACGG	CTACACTAGA	AGGACAGTAT	4980
TTGGTATCTG	CGCTCTGCTG	AAGCCAGTTA	CCTTCGGAAA	AAGAGTTGGT	AGCTCTTGAT	5040
CCGGCAAACA	AACCACCGCT	GGTAGCGGTG	TTTTTTTG	TTGCAAGCAG	CAGATTACGC	5100
GCAGAAAAAA	AGGATCTCAA	GAAGATCCTT	TGATCTTTTC	TACGGGGTCT	GACGCTCAGT	5160
GGAACGAAAA	CTCACGTTAA	GGGATTTGG	TCATGAGATT	ATCAAAAAGG	ATCTTCACCT	5220
AGATCCTTT	AAATTAAAAAA	TGAAGTTTA	AATCAATCTA	AACTATATAT	GAGTAAACTT	5280
GGTCTGACAG	TTACCAATGC	TTAACATCAGT	AGGCACCTAT	CTCAGCGATC	TGTCTATTTC	5340
GTTCATCCAT	AGTTGCCTGA	CTCCCCGTCG	TCTAGATAAC	TACGATACGG	GAGGGCTTAC	5400
CATCTGGCCC	CAGTGCTGCA	ATGATACCGC	GAGACCCACG	CTCACCGGCT	CCAGATTTAT	5460
CAGCAATAAA	CCAGCCAGCC	GGAAAGGGCG	AGCGCAGAAG	TGGTCTGTCA	ACTTTATCCG	5520
CCTCCATCCA	GTCTATTAAT	TGTTGCCGGG	AAGCTAGAGT	AACTAGTTCG	CCAGTTAATA	5580
GTTCGCGCAA	CGTTGTTGCC	ATTGCTACAG	GCATCGTGGT	GTCACGCTCG	TCGTTGGTA	5640
TGGCTTCATT	CAGCTCCGGT	TCCCAACGAT	CAAGGCAGT	TACATGATCC	CCCATGTTGT	5700
GCAAAAAAGC	GGTTAGCTCC	TTCGGTCTC	CGATCGTTGT	CAGAAGTAAG	TTGGCCGCAG	5760
TGTTATCACT	CATGGTTATG	GCAGCACTGC	ATAATTCTCT	TACTGTCATG	CCATCCGTAA	5820
GATGCTTTTC	TGTGACTGGT	GAGTACTCAA	CCAAGTCATT	CTGAGAATAG	TGTATGCGGC	5880
GACCGAGATG	CTCTTGCCCC	GGGTCAATAC	GGGATAATAC	CGGCCACAT	AGCAGAACTT	5940
TAAAAGTGT	CATCATTGGA	AAACGTTCTT	CGGGCGAAA	ACTCTCAAGG	ATCTTACCGC	6000
TGTTGAGATC	CAGTTCGATG	TAACCCACTC	GTGCACCCAA	CTGATCTTCA	GCATCTTTA	6060
CTTCACCCAG	CGTTTCTGGG	TGAGCAAAAAA	CAGGAAGGCA	AAATGCCGCA	AAAAAGGGAA	6120
TAAGGGCGAC	ACGGAAATGT	TGAATACTCA	TACTCTTCCT	TTTCAATAT	TATTGAAGCA	6180
TTTATCAGGG	TTATTGTCTC	ATGAGCGGAT	ACATATTG	ATGTATTTAG	AAAAATAAAC	6240
AAATAGGGGT	TCCGCGCACA	TTTCCCCGAA	AAAGTCCCACC	T		6281

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 5679 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

GACGTCGGCG	CGCGCTCTAGG	CCTCCAAAAA	AGCCTCCCTCA	CTACTTCTGG	AATAGCTCAG	60
AGGCCCGAGGC	GGCCTCGGCC	TCTGCATAAA	TAAAAAAAAT	TAGTCAGCCA	TGCATGGGGC	120
GGAGAATGGG	CGGAACTGGG	CGGAGTTAGG	GGCGGGATGG	GGGGAGTTAG	GGGGGGACT	180
ATGGTTGCTG	ACTAATTGAG	ATGCATGCTT	TGCATACTTC	TGCCTGCTGG	GGAGCCTGGG	240
GA CTTCCAC	ACCTGGTTCC	TGACTAATTG	AGATGCATGC	TTTGCACTACT	TCTGCCTGCT	300
GGGGAGCCCTG	GGGACTTTCC	ACACCCCTAAC	TGACACACAT	TCCACAGAAAT	TAATTCCCGG	360
GGATCGATCC	GTCGACGTAC	GA CTTTAT	TAATAGTAA T	CAATTACGGG	GTCATTAGTT	420
CATAGCCCAT	ATATGGAGTT	CCGCGTTACA	TAACTTACGG	TAAATGGCCC	GCCTGGCTGA	480
CCGCCCAACG	ACCCCCGCC	ATTGACGTCA	ATAATGACGT	ATGTTCCAT	AGTAACGCCA	540
ATAGGGACTT	TCCATTGACG	TCAATGGGTG	GA CTTTAC	GGTAAACTGC	CCACTTGGCA	600
GTACATCAAG	TGTATCATAT	GCCAAGTACG	CCCCCTATTG	ACGTCAATGA	CGGTAAATGG	660
CCCGCCTGGC	ATTATGCCCA	GTACATGACC	TTATGGGACT	TTCTCTACTTG	GCAGTACATC	720
TACGTATTAG	TCATCGCTAT	TACCATGGTG	ATGCCTTTT	GGCAGTACAT	CAATGGCGT	780
GGATAGCGGT	TTGACTCACG	GGGATTCCA	AGTCTCCACC	CCATTGACGT	CAATGGGAGT	840
TTGTTTGGC	ACCAAAATCA	ACGGGACTTT	CCAAAATGTC	GTAACAACTC	CGCCCCATTG	900
ACGCCAAATGG	GCGGTAGCG	TGTACGGTGG	GAGGTCTATA	TAAGCAGAGC	TGGGTACGTG	960
AACCGTCAGA	TCGCTGGAG	ACGCCATCGA	ATTCTGAGCA	CACAGGACCT	CACCATGGGA	1020
TGGAGCTGTA	TCATCCTCTT	CTTGGTAGCA	ACAGCTACAG	GTGTCCACTC	CGAGCTCACG	1080
CAGCCGCCCT	CAGTCTCTGC	GGCCCCAGGA	CAGAAGGTCA	CCATCTCTG	CACTGGGAGC	1140
AGCTCCAACC	TCGGGGCAGG	TTATGATGTT	CACTGGTACC	GGCAACTTCC	AGGGACAGCC	1200
CCCAAACCTCC	TCATCTATGA	TAACAAACAT	CGGCCCTCAG	GGGTCCCTGA	CCGATTCTCT	1260
GGCTCCAAGT	CTGGCCCTTC	AGCCTCCCTG	GCCATCTCTG	GGCTCCAGGC	TGAGGATGAG	1320
GCTGATTATT	ACTGCCAGTC	CTATGACAGC	AGCCTGAATG	GTTATGTCTT	CGGAACATGGG	1380
ACCCAGCTCA	CCGTCCTAGG	TCAGCCCAAG	GCTGCCCTC	CGGTCACTCT	GTTCCCGCCC	1440
TCCTCTGAGG	AGCTTCAAGC	CAACAAGGCC	ACACTGGTGT	GTCTCATAG	TGACTTCTAC	1500
CCGGGAGCCG	TGACAGTGGC	CTGGAAAGGC	ATTACCAAGCC	CGGTCAAGCC	GGGAGTGGAG	1560
ACCACCAACAC	CCTCCAAACA	AAGCAACAAAC	AAGTACGGGG	CCAGCAGCTA	TCTGAGCCTG	1620
ACGCCTGAGC	AGTGGAAAGTC	CCACAGAAGG	TACAGCTGCC	AGGTCAAGCA	TGAAGGGAGC	1680
ACCGTGGAGA	AGACAGTGGC	CCCTACAGAA	TGTTCATAGT	TCTAGATCTA	CGTATGATCA	1740
GCCTCGACTG	TGCCTTCTAG	TTGCCAGCCA	TCTGTTGTTT	GCCCCCTCCC	CGTGCCTTCC	1800
TTGACCTCTGG	AAGCTGCCAC	TCCCACGTGTC	CTTTCTTAAT	AAAATGAGGA	AATTGCATCG	1860
CATTGTCTGA	GTAGGTGTCA	TTCTATTCTG	GGGGGTGGGG	TGGGGCAGGA	CAGCAAGGGG	1920

GAGGATTGGG AAGACAATAG CAGGCATGCT GGGGATGCGG TGGGCTCTAT GGAACCAGCT	1980
GGGGCTCGAC AGCTCGAGCT AGCTTTGCTT CTCAATTCTCT TATTGCGATA ATGAGAAAAAA	2040
AAGGAAAATT AATTTAACCA CCAATTCACT AGTTGATTGA GCAAATGCGT TGCCAAAAG	2100
GATGCTTTAG AGACAGTGTT CTCTGCACAG ATAAGGACAA ACATTATTCA GAGGGAGTAC	2160
CCAGAGCTGA GACTCCTAACG CCAGTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT	2220
CATCACCGAA GCCTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG	2280
GATAGAGAGG GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC	2340
ACATTGCTT CTGACATAGT TGTGTTGGG GCTTGGATCG ATCCACCATG GTTGAACAAAG	2400
ATGGATTGCA CCCAGGTTCT CCGGCCGCTT GGGTGGAGAG GCTATTGCGC TATGACTGGG	2460
CACAAACAGAC AATCGGCTGC TCTGATGCCG CCGTGTCCG GCTGTCAGCG CAGGGCGCC	2520
CGGTTCTTT TGTCAAGACC GACCTGTCGG CTCCTTGCGC AGCTGTGCTC GACGTTGTCA	2580
CGCGGCTATC GTGGCTGGCC ACGACGGCG TTCCCTGCGC AGCTGTGCTC GACGTTGTCA	2640
CTGAAGCGGG AAGGGACTGG CTGCTATTGG GCGAAGTGCC GGGGCAGGAT CTCCGTGTCAT	2700
CTCACCTTGC TCTGCCGAG AAAGTATCCA TCATGGCTGA TGCAATGCCG CGGCTGCATA	2760
CGCTTGATCC GGCTACCTGC CCATTCGACC ACCAAGCGAA ACATCGCATC GAGCGAGCAC	2820
GTACTCGGAT GGAAGCCGGT CTTGTCGATC AGGATGATCT GGACGAAGAG CATCAGGGC	2880
TCGCCCCAGC CGAACTGTTG GCCAGGCTCA AGGCGCCAT GCCCCACGGC GAGGATCTCG	2940
TCGTGACCCA TGGCGATGCC TGCTTGCGA ATATCATGGT GGAAATGGC CGCTTTCTG	3000
GATTCACTCGA CTGTGCCGG CTGGGTGTGG CGGACCGCTA TCAGCACATA GCGTTGGCTA	3060
CCCGTGATAT TGCTGAAGAG CTTGGCGGCC AATGGGCTGA CGCCTTCCTC GTGCTTTACG	3120
GTATGCCGC TCCCGATTCTG CAGCGCATCG CCTTCTATCG CCTTCTTGAC GAGTTCTTCT	3180
GAGCGGGACT CTGGGGTTCG AAATGACCGA CCAAGCGACG CCCAACCTGC CATCACCGAGA	3240
TTTCGATTCC ACCGGCGCCT TCTATGAAAG GTTGGGCTTC GGAATCGTT TCCGGGACGC	3300
CGGCTGGATG ATCCCTCCAGC GCGGGGATCT CATGCTGGAG TTCTTCGCC ACCCCAACTT	3360
GTTTATTGCA GCTTATAATG GTTACAAATA AAGCAATAGC ATCACAAATT TCACAAATAA	3420
ACCATTTTT TCAC TGCACTT CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATG TATCTTATCA	3480
TGTCTGGATC GCGGGCGCGA TCCCGTCGAG AGCTTGGCGT AATCATGGTC ATAGCTGTTT	3540
CCTGTGTGAA ATTGTTATCC GCTCACAAATT CCACACAAACA TACGAGCCGG AAGCATAAAG	3600
TGTAAAGCCT GGGGTGCCTA ATGAGTGAGC TAACTCACAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG	3660
CCCGCTTCTC AGTCGGAAA CCTGTCGTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG	3720
GGGAGAGGCG GTTTCGTAT TGGCGCTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGC	3780

TCGGTCTTC GGCTGGGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGGCGTAAT ACGGTTATCC	3840
ACAGAAATCAG GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG	3900
AAACCGTAAAA AGGCCGGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCCC TGACGAGCAT	3960
CACAAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG	4020
GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGCAG TCTCGTTC CGACCCCTGCC GCTTACCGGA	4080
TACCTGTCGG CCTTTCTCCC TTCCGGAAAGC GTGGCCCTTT CTCAAATGCTC ACGCTGTAGG	4140
TATCTCAGTT CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT	4200
CAGCCCGACCC GCTGCCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC	4260
GAATTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC	4320
GGTGCTACAG AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT ACACATAGAAG GACAGTATTT	4380
GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC	4440
GGCAAAACAAA CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTTGTGTT GCAAGCAGCA GATTACGCC	4500
AGAAAAAAAG GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTCTA CGGGCTCTGA CGCTCAGTGG	4560
AACGAAAAGT CACGTTAAGG GATTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTCACCTAG	4620
ATCCTTTAA ATTTAAATG AAGTTTAAAG TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG	4680
TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCACTGAG GCACCTATCT CAGGGATCTG TCTATTTG	4740
TCATCCATAG TTGCGCTGACT CCCCGTCTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA	4800
TCTGGCCCCA GTGCTGCAAT CATAACCGCGA GACCCACGCT CACCCGCTCC AGATTTATCA	4860
GCAAAATAACCC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC	4920
TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGCGGGAA GCTAGAGTAA GTACTTCGCC AGTTAATAGT	4980
TTGGCCAACG TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACCGCTCGTC GTTTGGTATG	5040
GCTTCATTCA GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGGAGGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC	5100
AAAAAAGCGG TTAGCTCCTT CGGTCCCTCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCAGTG	5160
TTATCACTCA TGCTTATGGC ACCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA	5220
TGCTTTCTG TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCAG	5280
CCGAGTTGCT CTTGCCCCGGC GTCAATAACCG GATAATAACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA	5340
AAAGTGCTCA TCATTGGAAA ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG	5400
TTGAGATCCA GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAAGT GATCTTCAGC ATCTTTACT	5460
TTCACCCAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAACCA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA	5520
AGGCCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT	5580
TATCAGGGTT ATGTCTCAT GAGGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA	5640
ATAGGGGTTG CGCGCACATT TCCCCGAAAAA GTGCCACCT	5679

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1442 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

GAATTCTGAG CACACAGGAC CTCACCAGG	60
ATGGAGCTG TATCATCCTC TTCTTGGTAG	
CAACAGCTAC AGGTGTCCAC TCCGAGGTGC AGCTGGTGA	120
GTCTGGGGA GGCTTGGTAC	
AGCCTGGGG GTCCTGAGA CTCTCCTGG CAGCCTCTG	180
AGTCTCCCTC AGTGGATACA	
AGATGAACTG GGTCCGCCAG GCTCCAGGGA AGGGGCTGGA	240
ATGGGTCTCT TCCATTACTG	
GTATGACTAA TTACATACAC TACTCAGACT CAGTGAAGGG	300
CCGATTCACC ATCTCCAGAG	
ACAACGCCAT GAACTCACTG TATCTGAAA TGAACAGCCT	360
GACAGCCGAG GACACGGGTG	
TTTATTATTG TCGCACACAA CCGGGGGAGC TGGGCCTTT	420
TGACCATTGG GCCCAGGGAA	
CCCTGGTCAC CGTCTCTCA GCCTCCACCA AGGGCCATC	480
GGTCTTCCCC CTGGCACCCCT	
CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGCTG	540
CCTGGTCAAG GACTACTTCC	
CCGAAACCGGT GACGGTGTGG TGGAACTCAG GCGCCCTGAC	600
CAGGGCGTGC CACACCTTCC	
CGGCTGTCT ACAGTCCTCA GGACTCTACT CCCTCAGCAG	660
CGTGGTGACC GTGCCCTCCA	
GCAGCTTGGG CACCCAGACC TACATCTGCA ACGTGAATCA	720
CAAGCCCCAG AACACCAAGG	
TGGACAAGAA AGTTGAGCCC AAATCTTGTG ACAAAACCTCA	780
CACATGCCCA CCGTGCCAG	
CACCTGAACCT CCTGGGGGGA CGTCAGTCT CCGTCTTCCC	840
CCCCAAAACCC AAGGACACCC	
TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGTGGT	900
GGACGTGAGC CACGAAGACC	
CTGAGGTCAA GTTCAACTCG TACGTGGACG GCGTGGAGGT	960
GCATAATGCC AAGACAAAGC	
CGCGGGAGGA GCACTACAAC AGCACGTACG GGGTGGTCAG	1020
CGTCCTCACC GTCTGCACCC	
AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC	1080
CAACAAAGCC CTCCCAGCCCC	
CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG	1140
AGAACCCACAG GTGTACACCC	
TGCCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA ACCAGGTCTAG	1200
CCTGACCTGC CTGGTCAAAG	
GCTTCTATCC CAGCGACATC GCGGTGGAGT GGGAGAGCAA	1260
TGGGAGCCG GAGAACAACT	
ACAAGACCAAC GCCTCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCTT	1320
CTTCTCTAC AGGAAGCTCA	
CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTCTC	1380
ATGCTCCGTG ATGCATGAGG	
CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGACCC TCTCCCTGTC	1440
TCCGGTAAA TGATAGATAT	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 762 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

GAATTCTGAG CACACAGGAC CTCACCATGG GATGGAGCTG TATCATCCTC TTCTTGGTAG	60
CAACAGCTAC AGGTGTCCAC TCCCAGTCTG TGTTGACGCA CCCGCCCTCA GTCTCTGCAG	120
CCCCAGGACA GAAGGTCACC ATCTCCTGCA CTGGGAGCAG CTCCAACCTC GGGGCAGGTT	180
ATGATGTTCA CTGGTACCGG CAACTTCCAG GGACAGCCCC CAAACTCCTC ATCTATGATA	240
ACAACAATCG GCCCTCAGGG CTCCCTGACC GATTCTCTGG CTCCAAGTCT GGCCTCTCAG	300
CCTCCCTGGC CATCTCTGGG CTCCAGGCTG AGGATGAGGC TGATTATTAC TGCCAGTCCT	360
ATGACAGCAG CCTGAATGGT TATGTCTTCG GAACTGGGAC CCAGCTCACC GTCCTAGGTC	420
AGCCCAAGGC TGCCCCCTCG GTCACTCTGT TCCCGCCCTC CTCTGAGGAG CTTCAAGCCA	480
ACAAGGCCAC ACTGGTGTGT CTCATAAGTG ACTTCTACCC GGGAGCCGTG ACAGTGGCCT	540
GGAAGGCAAT TAGCAGCCCC GTCAAGGCC GAGTGGAGAC CACCACACCC TCCAAACAAA	600
GCAACAACAA GTACGCGGCC ACCAGCTATC TGACCCCTGAC GCCTGAGCAG TGAAAGTCCC	660
ACAGAAGGTA CAGCTGCCAG GTCACGCATG AACGGAGCAC CGTGGAGAAG ACAGTGGCCC	720
CTACAGAATG TTCATAGTTC TAGATCTACG TATGATCAGC CT	762

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 6 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS:
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu
1			5		

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 6 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS:
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

Glu Val Gln Leu Val Glu
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1899 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 14..1735

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

GGGGCAAATA ACA ATG GAG TTG CTA ATC CTC AAA GCA AAT GCA ATT ACC	49
Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr	
1 5 10	
ACA ATC CTC ACT GCA GTC ACA TTT TGT TTT GCT TCT GGT CAA AAC ATC	97
Thr Ile Leu Thr Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile	
15 20 25	
ACT GAA GAA TTT TAT CAA TCA ACA TGC AGT GCA GTT AGC AAA GGC TAT	145
Thr Glu Glu Phe Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr	
30 35 40	
CTT AGT GCT CTG AGA ACT GGT TGG TAT ACC AGT GTT ATA ACT ATA GAA	193
Leu Ser Ala Leu Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu	
45 50 55 60	
TTA AGT AAT ATC AAG GAA AAT AAG TGT AAT GGA ACA GAT GCT AAG GTA	241
Leu Ser Asn Ile Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val	
65 70 75	
AAA TTG ATA AAA CAA GAA TTA GAT AAA TAT AAA AAT GCT GTA ACA GAA	289
Lys Leu Ile Lys Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu	
80 85 90	
TTG CAG TTG CTC ATG CAA AGC ACA CCA CCA ACA AAC AAT CGA GCC AGA	337
Leu Gln Leu Leu Met Gln Ser Thr Pro Pro Thr Asn Asn Arg Ala Arg	
95 100 105	

AGA GAA CTA CCA AGG TTT ATG AAT TAT ACA CTC AAC AAT GCC AAA AAA Arg Glu Leu Pro Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys 110 115 120	385
ACC AAT GTA ACA TTA AGC AAG AAA AGG AAA AGA AGA TTT CTT GGT TTT Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe 125 130 135 140	433
TTG TTA GGT GTT GGA TCT GCA ATC GCC AGT GGC GTT GCT GTA TCT AAG Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys 145 150 155	481
GTC CTG CAC CTA GAA GGG GAA GTG AAC AAG ATC AAA AGT GCT CTA CTA Val Leu His Leu Glu Gly Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu 160 165 170	529
TCC ACA AAC AAG CCT GTA GTC AGC TTA TCA AAT GGA GTT ACT GTC TTA Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu 175 180 185	577
ACC AGC AAA GTG TTA GAC CTC AAA AAC TAT ATA GAT AAA CAA TTG TTA Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu 190 195 200	625
CCT ATT GTG AAC AAG CAA AGC TGC AGC ATA TCA AAT ATA GAA ACT GTG Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val 205 210 215 220	673
ATA CAG TTC CAA CAA AAG AAC AAC AGA CTA CTA GAG ATT ACC AGG GAA Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu 225 230 235	721
TTT AGT GTT AAT GCA GGT GTA ACT ACA CCT GTA AGC ACT TAC ATG TTA Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu 240 245 250	769
ACT AAT AGT GAA TTA TTG TCA TTA ATC AAT GAT ATG CCT ATA ACA AAT Thr Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn 255 260 265	817
GAT CAG AAA AAG TTA ATG TCC AAC AAT GTT CAA ATA GTT AGA CAG CAA Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln 270 275 280	865
AGT TAC TCT ATC ATG TCC ATA ATA AAA GAG GAA GTC TTA GCA TAT GTC Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Val Leu Ala Tyr Val 285 290 295 300	913
GTA CAA TTA CCA CTA TAT GGT GTT ATA GAT ACA CCC TGT TGG AAA CTA Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu 305 310 315	961
CAC ACA TCC CCT CTA TGT ACA ACC AAC ACA AAA GAA GGG TCC AAC ATC His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile 320 325 330	1009
TGT TTA ACA AGA ACT GAC AGA GGA TGG TAC TGT GAC AAT GCA GGA TCA Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser 335 340 345	1057
GTA TCT TTC TTC CCA CAA GCT GAA ACA TGT AAA GTT CAA TCA AAT CGA Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg 350 355 360	1105

GTA TTT TGT GAC ACA ATG AAC AGT TTA ACA TTA CCA AGT GAA ATA AAT Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Ile Asn 365 370 375 380	1153
CTC TGC AAT GTT GAC ATA TTC AAC CCC AAA TAT GAT TGT AAA ATT ATG Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met 385 390 395	1201
ACT TCA AAA ACA GAT GTA ACC AGC TCC GTT ATC ACA TCT CTA GGA GCC Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala 400 405 410	1249
ATT GTG TCA TGC TAT GGC AAA ACT AAA TGT ACA GCA TCC AAT AAA AAT Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn 415 420 425	1297
CGT GGA ATC ATA AAG ACA TTT TCT AAC GGG TGC GAT TAT GTA TCA AAT Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn 430 435 440	1345
AAA GGG ATG GAC ACT GTG TCT GTA GGT AAC ACA TTA TAT TAT GTA AAT Lys Gly Met Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn 445 450 455 460	1393
AAG CAA GAA GGT AAA AGT CTC TAT GTA AAA GGT GAA CCA ATA ATA AAT Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn 465 470 475	1441
TTC TAT GAC CCA TTA GTA TTC CCC TCT GAT GAA TTT GAT GCA TCA ATA Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile 480 485 490	1489
TCT CAA GTC AAC GAG AAG ATT AAC CAG AGC CTA GCA TTT ATT CGT AAA Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys 495 500 505	1537
TCC GAT GAA TTA TTA CAT AAT GTA AAT GCT GGT AAA TCC ACC ACA AAT Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn 510 515 520	1585
ATC ATG ATA ACT ACT ATA ATT ATA GTG ATT ATA GTA ATA TTG TTA TCA Ile Met Ile Thr Thr Ile Ile Val Ile Val Ile Leu Leu Ser 525 530 535 540	1633
TTA ATT GCT GTT GGA CTG CTC TTA TAC TGT AAG CCC AGA AGC ACA CCA Leu Ile Ala Val Gly Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro 545 550 555	1681
GTC ACA CTA AGC AAA GAT CAA CTG AGT GGT ATA AAT AAT ATT GCA TTT Val Thr Leu Ser Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe 560 565 570	1729
AGT AAC TAAATAAAAA TAGCACCTAA TCATGTTCTT ACAATGGTTT ACTATCTGCT Ser Asn	1785
CATAGACAAAC CCATCTGTCA TTGGATTTTC TTAAAATCTG AACTTCATCG AAACTCTCAT	1845
CTATAAACCA TCTCACTTAC ACTATTTAAG TAGATTCCCTA GTTTATAGTT ATAT	1899

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 574 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Pro Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300
 Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320
 Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350
 Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365
 Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Ile Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380
 Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400
 Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415
 Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430
 Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Met Asp
 435 440 445
 Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460
 Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480
 Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495
 Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510
 Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
 515 520 525
 Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
 530 535 540
 Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
 545 550 555 560
 Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
 565 570

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 15 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (C) STRANDEDNESS:
 - (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

【図面の簡単な説明】

【図1A】 G λ -1 sc FVファージ結合のRSV19 mA b (国際特許出願公報第WO92/04381号、1992年3月19日公開)との競合を示すグラフである。

【図1B】 G λ -1 sc FVファージ結合のRSV B4 mA b (国際特許出願公報第WO93/20210号、1993年10月14日公開)との競合を示すグラフである。

【図2】 sc FVファージ、G λ -1、G λ -3およびG κ -1とRSV系統273によるウイルス中和を示すグラフである。

【図3】 G λ -1 L鎖可変領域、プロセッシングされたN末端から枠組み構造IVのDNA配列 (配列番号1) および蛋白質配列 (一文字コードにおいて報告されたアミノ酸) (配列番号2) を示す。

【図4】 G λ -1 H鎖可変領域、プロセッシングされたN末端から枠組み構造IVのDNA配列 (配列番号3) および蛋白質配列 (一文字コードにおいて報告されたアミノ酸) (配列番号4) を示す。

【図5】 G λ -1モノクローナル抗体の構築に使用されるクローニング法を示す。H鎖V領域をpCD誘導体ベクター中にXhoI-ApaIフラグメントとしてクローン化した。全L鎖V領域をpCN誘導体ベクター、43-1pcn中にSacI-AvrIIフラグメントとしてクローン化した。詳細は上記する。

【図6】 G λ -1一本鎖FvのH鎖アミノ酸配列 (配列番号5) と本発明の種々のモノクローナル抗体との比較を提供する。A (配列番号7) およびB (配列番号8) 構築物のH鎖のアミノ酸配列を示す。残基の番号は、生殖細胞系 (

G L) 遺伝子D p 5 8 (配列番号6)に基づき、成熟のプロセッシングされたアミノ末端で開始し、CDR 3で終結する。「-」は上記の配列との同一性を示す(例えば、Bと比べたA)。太字の残基はリーダー領域およびCDR 1-3に相当する。

【図7】 G λ -1 A 1 本鎖F v のL鎖アミノ酸配列(配列番号9)と本発明の種々のモノクローナル抗体の比較を提供する。A(配列番号1 1)およびB(配列番号1 2)構築物のL鎖アミノ酸配列を示す。V κ 領域の残基の番号は、生殖細胞系(G L)遺伝子D p L 8 (配列番号1 0)に基づき、成熟のプロセッシングされたアミノ末端で開始し、CDR 3で終結する。枠組み構造4を参照するために、実際の番号付もまたG λ -1 Aについて示される。図6と同様に、「-」は上記の配列との同一性を示す。

【図8】 図8 A~8 Fは、H鎖についてRSV中和ヒトG λ -1 mA bを含有する発現プラスミドG λ -1 A p c dの連続的なDNA配列(配列番号1 3)を示す。G λ -1 H鎖の翻訳開始、リーダーペプチド、アミノ末端プロセッシング部位、カルボキシ末端およびE c o R I制限エンドヌクレアーゼ切断部位を示す。

【図9】 図9 A~9 Eは、L鎖についてRSV中和ヒトG λ -1 mA bを含有する発現プラスミドG λ -1 A p c nの連続的なDNA配列(配列番号1 4)を示す。図8 A~8 Fと同様にL鎖について対応する特徴が示される。

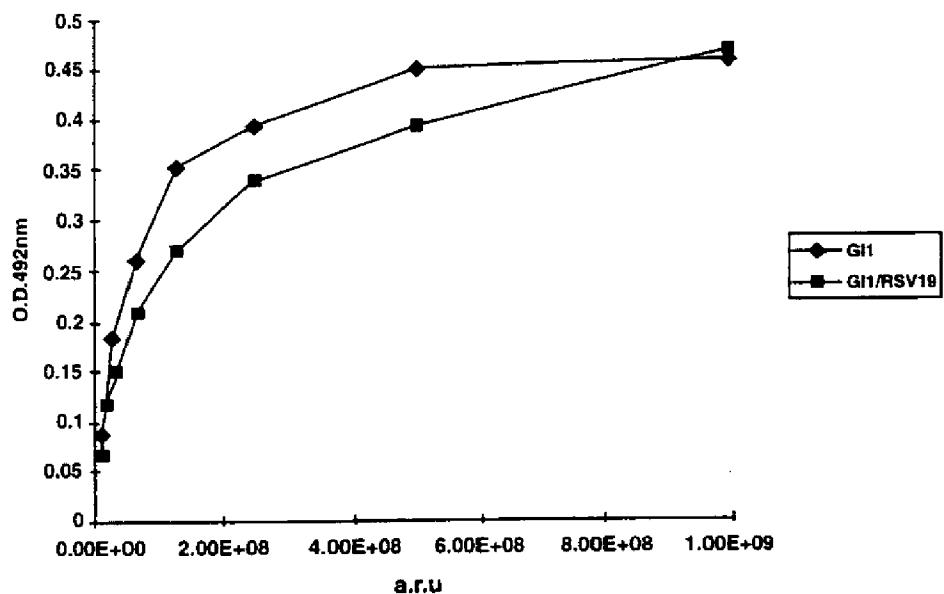
【図10】 図10 Aおよび10 Bは、プラスミドG λ -1 B p c dのH鎖のコーディング領域の連続的なDNA配列(配列番号1 5)を示す。太字の残基は、図8 A~8 F(配列番号1 3)におけるG λ -1 A p c dのための全ベクター配列との相違を示す。

【図11】 プラスミドG λ -1 B p c nのL鎖のコーディング領域のDNA配列(配列番号1 6)を示す。太字の残基は、図9 A~9 E(配列番号1 4)におけるG λ -1 A p c nの全ベクター配列との相違を示す。

【図 1 A】

Fig. 1A

RSV19/GI1 scFv ファージ競合



【図 1 B】

B4/GI1 scFv ファージ競合

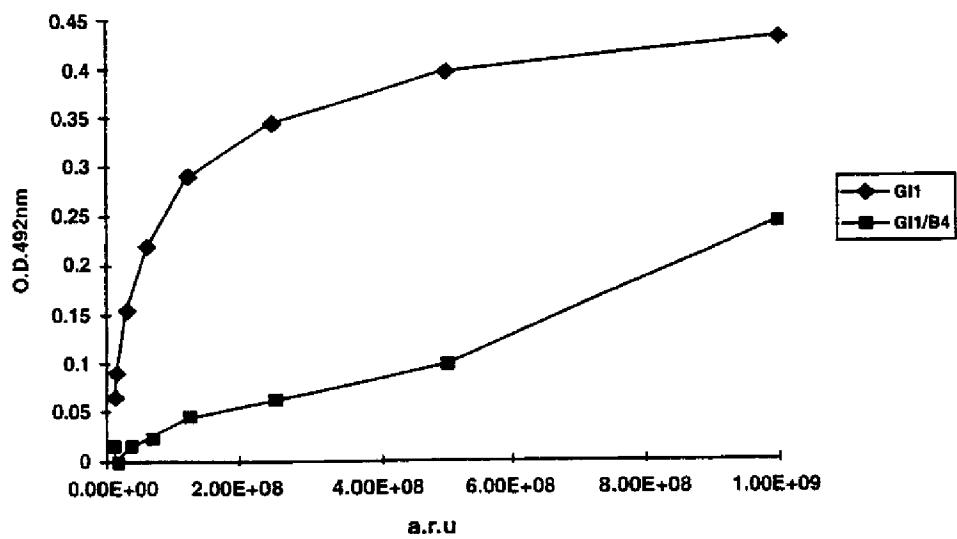
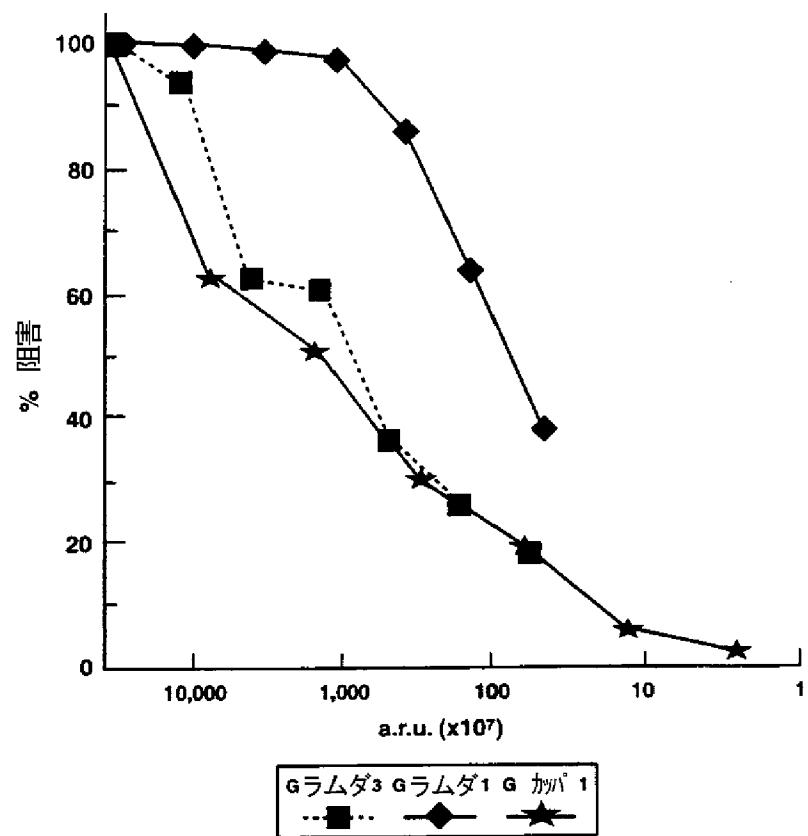


Fig. 1B

【図2】

Fig. 2

ファージFvを用いるRS/V/273の中和



【図3】

FIGURE 3

1	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTCTCTGCAGGACAGAA	50
	Q S V L T Q P P S V S A A A P G Q K	
51	GGTCACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACCTGGGGCAGGTTATG	100
	V T I S C T G S S S N L G A G Y D	
101	ATGTTCACTGGTACCGGCAACTTCCAGGGACAGCCCCAACTCCTCATC	150
	V H W Y R Q L P G T A P K L L I	
151	TATGATAACAACAATCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTC	200
	Y D N N N R P S G V P D R F S G S	
201	CAAGTCTGGCCCTCAGCCTCCCTGGCCATCTCTGGCTCCAGGCTGAGG	250
	K S G P S A S L A I S G L Q A E D	
251	ATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACAGCAGCCTGAATGGTTAT	300
	E A D Y Y C Q S Y D S S L N G Y	
301	GTCTTCGGAACCTGGGACCCAGCTCACCGTCTAGGT	336
	V F G T G T Q L T V L G	

【図4】

FIGURE 4

1	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTC	50
	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S	
51	CCTGAGACTCTCCTGCGCAGCCTCTGGAGTCTCCCTCAGTGGATACAAGA	100
	L R L S C A A S G V S L S G Y K M	
101	TGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGGTCTCTTCC	150
	N W V R Q A P G K G L E W V S S	
151	ATTACTGGTATGAGTAATTACATACACTACTCAGACTCAGTGAAGGGCCG	200
	I T G M S N Y I H Y S D S V K G R	
201	ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCATGAACACTCACTGTATCTGCAAATGA	250
	F T I S R D N A M N S L Y L Q M N	
251	ACAGCCTGACAGCCCAGGGACACGGGTGTTATTATTGTGCGACACAACCG	300
	S L T A E D T G V Y Y C A T Q P	
301	GGGGAGCTGGCGCCTTTGACCATTGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGT	350
	G E L A P F D H W G Q G T L V T V	
351	CTCCTCA	357
	S S	

【図5】

Figure 5

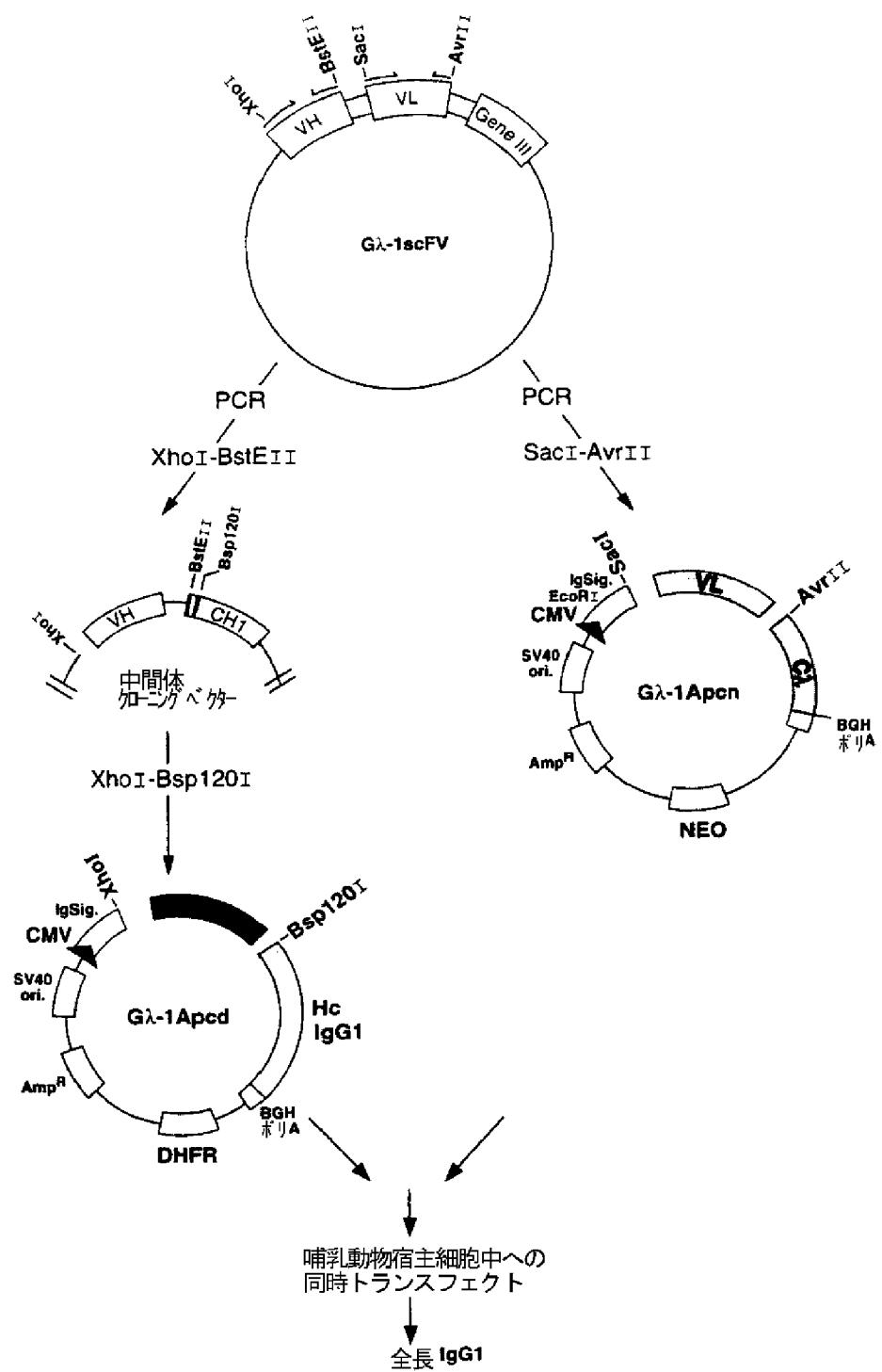


FIGURE 6

G λ -1一本鎖f_vとmAbの
H鎖アミノ酸配列の比較

リーダーおよび可変領域

GL Dp58:	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
G λ -1 scFv:	-----VSL-----
G λ -1A:	MGWSCIILFLVATATGVHS-----L-----
G λ -1B:	-----V-----
CDR1	

GL Dp58:	SYEMNWVRQAPGKGLEWVS YI SSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY
G λ -1 scFv:	G-K -----S-TGMSNY-H-S-----M-----
G λ -1A:	-----
G λ -1B:	-----
CDR2	

GL Dp58:	LQMNSLRAEDTAVYYCAR
G λ -1 scFv:	-----T-----G-----T QPGELAPFDHWGQGTLVTVSS
G λ -1A:	-----
G λ -1B:	-----
CDR3	

FIG 7
G λ -1A一本鎖FvとmA bの
L鎖アミノ酸配列の比較

リーダーおよび可変領域

	CDR1

GL DpL8:	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC TGSSSNIG
G λ -1 scFv:	-----A-----K-----L-----
G λ -1A:	MGWSCIILFLVATATGVHS E-----
G λ -1B:	-----QSV-----

	CDR2

GL DpL8:	AGYDVH WYQQQLPGTAPKLLIY GNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGL
G λ -1 scFv:	-----R-----D-N-----P-----S-----
G λ -1A:	-----
G λ -1B:	-----

	CDR3

GL DpL8:	QAEDEADYYC
G λ -1 scFv:	----- QSYDSSLNGYVFGTGTQLTVLG
G λ -1A:	-----
G λ -1B:	-----

【図8A】

FIGURE 8A

1 gacgtcgccgcgtctaggcctccaaaaagcctcactacttctgg
 51 aatagctcagaggccgaggcggcctcggcctctgcataaataaaaaaaat
 101 tagtcagccatgcatggggcggagaatgggcggaactgggcggagttagg
 151 ggcgggatgggcggagtttagggcggactatggttgctgactaatttagg
 201 atgcattgcatacttctgcctgctgggagcctgggactttccac
 251 acctggttgctgactaatttagatgcattgcatacttctgcctgct
 301 ggggagcctgggactttccacaccctaactgacacacattccacagaat
 351 taattcccgggatcgatccgtcgacgtacgacttagttatataatagtaat
 401 caattacgggtcattagttcatagccatataatggagttccgcgttaca
 451 taacttacggtaaatggccgcctggctgaccgcccacgaccccccggcc
 501 attgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagggactt
 551 tccattgacgtcaatgggtggactattacggtaaactgcccacttggca
 601 gtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatga
 651 cggtaaatggccgcctggcattatgccagatgaccttatggact
 701 ttcctacttggcagtatctacgtattagtcatcgctattaccatggtg
 751 atgcggtttggcagtatcaatggcgtggatagcggtttgactcag
 801 gggatttccaagtctccacccattgacgtcaatggagttttggc
 851 accaaaaatcaacggactttccaaaatgtcgtaacaactccgcatttg
 901 acgcaaatggcggtaggcgtgtacggtggaggtctatataaagcagagc

EcoRI

951 tgggtacgtgaaccgtcagatgcgcgtggagacgccatcgaaattctgagca
 1001 cacaggacctcaccatgggatggagctgtatcatcctttttggtagca
 M G W S C I I L F L V A
 リーダー 開始

XbaI

1051 acagctacaggtgtccactccgaggccaaactgctcgagtcgtctggggagg
 T A T G V H S E V Q L L E S---

プロセッシングされたN末端

【図8B】

FIGURE 8B

1101 cttggcacggctgggggtccctgagactctcctgcgcagcctctggag
 1151 tctccctcagtggatacaagatgaactgggtccgcaggctccaggaaag
 1201 gggctggaatgggtcttccattactggtatgagtaattacatacacta
 1251 ctcagactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccatga
 1301 actcaactgtatctgcaaattgaacacgcctgacagccgaggacacgggtgtt
 1351 tattattgtgcgacacaaccggggagctggcgccctttgaccattgggg

 1401 ccagggaaccctggtaccgttcaccgttcaccgtccaccaaaaggggccatcg
 Q G T L V T V S S /
 枠組み構造 IV / CH1

 1451 tcttccccctggcaccccctccctcccaagagacaccttggggcaacagcgggcc
 1501 ctgggctgcctggtcaaggactacttcccgaaccgggtacgggttcgtg
 1551 gaactcagggcccctgaccagcggggtgcacacctccggctgtcctac

 1601 agtcctcaggacttactccctcagcgcgtgggtaccgtgcccctccagc

 1651 agcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaa

 1701 caccaagggtgacaagaaagttgagccaaatttgtgacaaaaactcaca

 1751 catgcccaccgtgccagcacctgaactccttgggggaccgtcagtcc

 1801 ctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctga

 1851 ggtcacatgcgtggtgggacgtgagccacgaagacccctgaggtcaagt

 1901 tcaactggtacgtggacgggtggagggtgcataatgccaaagacaaagccg

 1951 cgggaggaggacgtacacacagacgtacccgggtgcagcgtcctaccgt

 2001 cctgcaccaggactggctggaatggcaaggaggtacagtgcaaggtctcca

 2051 acaaagccctccagccccatcgagaaacatctccaaagccaaaggg

 2101 cagccccgagaaccacagggttacaccctgccccatcccggatgagct

 2151 gaccaagaaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaaggcttatcca

【図 8 C】

FIGURE 8C

【図8D】

FIGURE 8D

3401 tagttctcagttagagaactcaaagaaccaccacgaggagctatTTCTT
3451 gccaaaagttggatgatgcctaagacttattgaacaaccggaaattggc
3501 aagtaaaagttagacatggttggatagtcggaggcagttctgtttaccagg
3551 aagccatgaatcaaccaggccaccttagactcttgcataaggatcatg
3601 caggaatttggaaagtgacacgtttcccagaaattgattggggaaata
3651 taaacttctccagaatacccaggcgtctctgaggtccaggaggaaa
3701 aaggcatcaagtataagttgaagtctacgagaagaaagactaacaggaa
3751 gatgtttcaagttctctgtccctctaaagctatgcattttataag
3801 accatgggactttgctggctttagatcagcctcgactgtgccttctagt
3851 tgccagccatctgttgcctgcctcccccgtgccttccttgaccctgg
3901 aggtgccactccactgtccttcctaataaaatgagggaaattgcattcgc
3951 attgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggtgggcaggac
4001 agcaagggggaggattggaaagacaatagcaggcatgctgggatgcgg
4051 gggctctatggaaaccagctgggctcgatcgagtgtatgactgcggccgc
4101 gatcccgtcgagagcttggcgtaatcatggcatagctgttctgtgt
4151 aaattgttatccgctcacaattccacacaacatacgagccgaaagcataa
4201 agtgtaaagcctgggtgcctaattgagttagctactcacattaattgcg
4251 ttgcgtcactgcccgttccagtcggaaacctgtcgccagctgca
4301 ttaatgaatcgccaaacgcgcgggagaggcggttgcgtattggcgct
4351 cttccgttccctcgctcactgactcgctgcgtcggtcggtcg
4401 cgagcggtatcgactcactcaaaggcggtaatacggttacccacagaatc
4451 agggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggcca
4501 ggaaccgtaaaaaggccgcgttgcgtggctttccataggctccgcccc
4551 cctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccc
4601 gacaggactataagataaccaggcgttccccctggaaagctccctcg

【図8 E】

FIGURE 8E

4651 gctctcctgttccgaccctgcccgttaccggataccctgtccgccttttc
4701 ctttcgggaagcgtggcgcttctcaatgctcacgctgttaggtatctcag
4751 ttccgggttaggtcggtcgctccaagctggctgtgtcacgaacccccc
4801 ttccagccgaccgctgcgccttatccgtaactatcgcttgcgttgc
4851 ccggtaagacacgacttacgccactggcagcagccactggtaacaggat
4901 tagcagagcgaggtatgttaggcggtgctacagatcttgcgttgc
4951 ctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgcctgt
5001 aaggccagttaccccgaaaaagatggtagcttgcgttgc
5051 aaccaccgtggtagccgggttttttttttttttttttttttttttttt
5101 gcagaaaaaaaaggatctcaagaagatcccttgcgttgc
5151 gacgctcagtggaaacgaaaaactcacgttaagggttttttttttttt
5201 atcaaaaaggatcttccacccatgcgttgc
5251 aatcaatctaaagtatataatgc
5301 ttaatcagtggcacctatctcagcgatctgtctatttgc
5351 agttgcctgactccccgtcgtagataactacgatacgggagggttac
5401 catctggcccccagtgcgtcaatgataccgcgagacccacgctcacggct
5451 ccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaaggccgagcgc
5501 tggtcctgcaactttatccgcctccatccagtc
5551 aagcttagagtaagtagttcgccagttaaatgc
5601 attgctacaggcatcggtgtcacgcgtcgatggcttgc
5651 cagctccgggttcccaacgatcaaggcgagttacatgc
5701 gcaaaaaagcggttagctcccggtcccgatcgatggcttgc
5751 ttggccgcagtgtagtgc
5801 tactgtcatgc
ccatccgtaaatgc
ttttctgtgactgg
gtgactctca
aa

【図8F】

FIGURE 8F

5851 ccaagtcatctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgtcttgcccg
5901 gcgtcaatacggataataccgcgcacatagcagaactttaaaagtgtct
5951 catcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttacgc
6001 tggtgagatccagttcgatgtaaaccactcgtgcacccaactgtatctca
6051 gcatctttacttcaaccagcgttctgggtgagcaaaaacaggaaggca
6101 aaatgccgcaaaaaaggaaataagggcgacacggaaatgtgaataactca
6151 tactcttcctttcaatattattgaagcattatcagggttattgtctc
6201 atgagoggatacatattgaatgtattttagaaaaataaacaatagggt
6251 tccgcgcacattccccgaaaagtgcacac

【図9A】

FIGURE 9A

1 gacgtcgccgcgtctaggcctccaaaaagcctcactacttctgg
 51 aatagctcagaggccgaggcggcctcggcctctgcataaataaaaaaaat
 101 tagtcagccatgcatgggcggagaatggcggacttggcggagtttagg
 151 ggcggatggcggagtttagggcggactatggttgctgactaatttagg
 201 atgcattgttcatacttctgcctgctgggagcctgggactttccac
 251 acctggttgctgactaatttagatgcattgcatacttctgcctgct
 301 ggggagcctgggactttccacaccctaactgacacacattccacagaat
 351 taattccgggatcgatccgtcgacgtacgacttagttattaatagtaat
 401 caattacgggtcattagttcatagccatataatggagttccgcgttaca
 451 taacttacggtaaatggccgcctggctgaccgcacacggcc
 501 attgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaataggactt
 551 tccattgacgtcaatgggtggactattacggtaaactgcccacttggca
 601 gtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccattgacgtcaatga
 651 cggtaaatggccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatggact
 701 ttcctacttggcagtacatctacgtattagtcattacatggcttaccatggtg
 751 atgcggtttggcagtacatcaatggcgtggatagcggtttgactcacg
 801 gggatttccaagtctccacccattgacgtcaatggagttttggc
 851 accaaaatcaacggactttccaaaatgtcgtaacaactccgcattg
 901 acgcaaatggcggtaggcgttacggtggaggtctatataagcagagc

EcoRI

951 tgggtacgtgaaccgtcagatgcctggagacgccatcgaaattctgagca
 1001 cacaggacctcaccatgggatgggagctgtatcatccttttttagca

M	G	W	S	C	I	I	L	F	L	V	A
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

リーダー 開始

SacI

1051 acagctacaggtgtccactccggactccgagctcacgccagcccctcagtcttcg
 T A T G V H S E L T Q --

プロセッシングされたN末端

【図9B】

FIGURE 9B

1101 ggccccaggacagaaggcaccatctcctgcactggagcagctccaacc
 1151 tcggggcaggttatgtatgttactggtaccggcaacttccagggacagcc
 1201 cccaaactcctcatctatgataacaacaatcgccctcaggggtccctga
 1251 ccgattctctggctccaagtctggccctcagcctccctggccatctcg
 1301 ggctccaggctgaggatgaggctgattattactgccagtcctatgacagc
 1351 agcctgaatggttatgtctcggaactgggacccagctcaccgtccttagg
 T Q L T V L G
 桁組み構造 IV / Cλ
 1401 tcagcccaaggctgccccctcggtcactctgttcccgcctcctgagg
 1451 agcttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctcataagtgacttctac
 1501 ccgggagccgtgacagtggcctggaaggcaattagcagccccgtcaaggc
 1551 gggagtggagaccaccacaccctccaaacaaagcaacaacaagtacgcgg
 1601 ccagcagctatctgagcctgacgcctgagcagtggaaagtcccacagaagg
 1651 tacagctgccaggtcacgcatgaagggagcaccgtggagaagacagtggc
 1701 ccctacagaatgttcatagttctagatctacgttatgatcagcctcgactg
 P T E C S * C末端 L鎖
 1751 tgccttctagttgccagccatctgttgtttgcctcccccgtgccttcc
 1801 ttgaccctggaagggtgccactcccactgtcccttcctaataaaatgagga
 1851 aattgcatcgcatgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggg
 1901 tggggcaggacagaagggggaggattggaaagacaatagcaggcatgt
 1951 ggggatgcgggtggcttatgaaaccagctgggctcgacagctcgagct
 2001 agctttgcttcaatttttatgtcataatgagaaaaaaaaggaaaaatt
 2051 aattttAACACCAATTCTAGTTGATTGAGCAAATGCGTTGCCAAAAAG
 2101 gatgctttagagacagtgttctgcacagataaggacaaacattattca
 2151 gagggagttacccagagctgagactcctaagccagtgagtggcacagcatt

【図9C】

FIGURE 9C

2201 ctagggagaaaatatgcttgtcatcaccgaaggcctgattccgttagagccac
2251 accttggtaagggccaatctgctcacacaggatagagagggcaggagcca
2301 gggcagagcatataaggtaggttaggatcagttgtcctcacattgtt
2351 ctgacatagttgtgtggagcttggatcgatccaccatggtaacaag
2401 atggattgcacgcaggttctccggccgcttggggagaggctattcggc
2451 tatgactggcacaacagacaatcgctgtatgccggcgttccgg
2501 gctgtcagcgcagggcgcccggttctttgtcaagaccgacctgtccg
2551 gtgcctgaatgaactgcaggacgaggcagcgcggctatcgtggctggcc
2601 acgacgggcgttcttgcgcagctgtgtcgacgttgcactgaagcggg
2651 aaggactggctgttattggcgaagtgcggggcaggatctcctgtcat
2701 ctcacccgttgcctgcggagaaagtatccatcatggctgtatgcattgg
2751 cggctgcatacgcttgcattccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaa
2801 acatcgcatcgagcgagcacgtactcgatggaaagccggcttgcgatc
2851 aggatgatctggacgaagagcatcagggctcgccagccgaaactgttc
2901 gccaggctcaaggcgcatgcccacggcgaggatctcgatgcacc
2951 tggcgatgcctgttgcgaatatcatggtaaaaatggccgctttctg
3001 gattcatcgactgtggccggctgggtgtggccggaccgctatcaggacata
3051 gcgttggctacccgtatattgtgaagagcttggccggcgaatggctga
3101 ccgccttcgtgttacggatcgccgtcccgattcgcagcgcatcg
3151 cttctatcgcccttgcgttgcggactctgggttc
3201 aaatgaccgaccaaggcgacgcccacctgcacatcagagattcgatcc
3251 accgcgccttcatgaaagggttggcttcggatcgatgtttccgggaacgc
3301 cggctggatgatccctcagcgcgggatctcatgcgtggagttttccgg
3351 accccaactgtttattgcagctataatggttacaaataaagcaatagc

【図9D】

FIGURE 9D

3401 atcacaaatttcacaaataaaggatttttcactgcattctagttgtgg
3451 tttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatcgcggccgca
3501 tccccgtcgagagcttggcgtaatcatggtcatagctgtttccgtgtgaa
3551 attgttateccgctcacaattccacacaacatacggccgaaagcataaag
3601 tgtaaaaggcctgggtgcctaattggatggctactcacatattgcgtt
3651 gcgcgtcactgcggcgtttccagtcggaaacctgtcgtgcagctgcatt
3701 aatgaatcgccaaacgcgcggggagaggcggttgcgtattggcgctct
3751 tccgcttcctcgctcactgactcgctgcgtcggtcggtcgccg
3801 agcggtatcagctcactcaaaggcgtaatacggttatccacagaatcag
3851 gggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccagg
3901 aaccgtaaaaaggccgcgttgcgtggcggtttccataggctccggcccccc
3951 tgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccgaa
4001 caggactataaagataaccaggcggtttccctggaaagctccctcgcc
4051 tctcctgttccgaccctgcccgttaccggataacctgtccgccttctccc
4101 ttccggaaagcgtggcgcttctcaatgctcacgctgttaggtatctcagtt
4151 cggttaggtcggtcgctccaagctggcggtgtgcacgaaccccccgtt
4201 cagccccgaccgctgcgccttacccggtaactatcgcttgcgttccaaaccc
4251 ggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattta
4301 gcagagcgaggtatgttaggcgggtgcatacagagttttgaagtggtggcct
4351 aactacggctacactagaaggacagtattttgtatctgcgtctgtgaa
4401 gccagttaccccgaaaaagagttggtagctttgtatccggcaaaacaaa
4451 ccaccgctggtagcggtggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgc
4501 agaaaaaaaaaggatctcaagaagatcccttgcgttttacgggtctga
4551 cgctcagtggaaacgaaaactcacgttaaggatttggtcatgagattat

FIGURE 9E

4601 caaaaaggatcttacacctagatcctttaaattaaaaatgaagtttaaa
4651 tcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgctt
4701 aatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatticgttcatccatag
4751 ttgcctgactccccgtcgtagataactacgatacgggagggcttacca
4801 tctggccccagtgctgcaatgatacccgcgagacccacgctcaccggctcc
4851 agatttatcagaataaaccagccagccggaaaggggccgagcgcagaagtg
4901 gtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattttgcgggaa
4951 gctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgcgcatt
5001 tgctacaggcatcggtgtcacgctcgctgttatggcttcatca
5051 gctccgggtcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgc
5101 aaaaaaagcggttagtcctcggtccatcgatcggttcagaagtaagtt
5151 ggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcaactgcataattcttca
5201 ctgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtactcaacc
5251 aagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgcatttgcggc
5301 gtcaatacggataatacccgccacatagcagaactttaaaagtgc
5351 tcattggaaaacgttctcgccgaaaactctcaaggatttaccgctg
5401 ttgagatccagttcgatgttaaccactcgacccactgatcttcagc
5451 atctttactttcaccagcggttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaa
5501 atgcgcgaaaaaggaaataaggcgacacggaaatgttgaataactcata
5551 ctcttcctttcaatattattgaagcattatcagggttattgtctcat
5601 gagcgatacatattgaatgtatttagaaaaataaacaatagggttc
5651 cgccacattccccgaaaagtgcaccc

【図10A】

FIGURE 10A														
										EcoRI				
										<u>gaattctgagca</u>				
										1000				
cacaggacccaccatgggatggagctgttatcatcctctttggtagca										1050				
M	G	W	S	C	I	I	L	F	L	V	A			
acagctacaggtgtccactccgaggt <u>gcag</u> ctgg <u>gtgg</u> agtcggggagg										1100				
T	A	T	G	V	H	S	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>Q</u>	L	V	E	S	-
N- 末端														
cttggcacagcctgggggtccctgagactctcctgcgcagcctctggag										1150				
tctccctcagtggatacaagatgaactgggtccgccaggctccaggaaag										1200				
gggctggaatgggtctttcattactggtatgagtaattacatacacta										1250				
ctcagactcagtgaagggccattcaccatctccagagacaacgccatga										1300				
actcactgtatctgcaaatacagcctgacagccgaggacacgggtgtt										1350				
tattattgtgcgacacaaccggggagctggcgctttgaccattgggg										1400				
										Bsp120I				
ccagggAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCA <u>aggggcc</u> atcg										1450				
tcttccccctggcacccctcccaagagcacccactggggcacagcggcc										1500				
ctgggctgcctggtaaggactacttccccgaaccgggtacgggtcg										1550				
gaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacccctccggctgtcctac										1600				
agtccctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtccctccagc										1650				
agcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaa										1700				
caccaagggtggacaagaagttgagccaaatcttgtgacaaaactcaca										1750				
catgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttc										1800				
ctcttcccccaaaaccaaggacaccctcatgatctccggaccctga										1850				
ggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagt										1900				
tcaactggtaacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccg										1950				
cgggaggaggcgtacaacacagcacgtaccgggtggtcagcgtccaccgt										2000				
cctgcaccaggactggtaatggcaaggagtacaagtgcaggtctcca										2050				

【図10B】

FIGURE 10B

acaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggg	2100
cagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatccggatgagct	2150
gaccaagaaccaggtaagcctgacctgcctggtaaaaggtttatccca	2200
gcgacatgcgcgtggagtggagagcaatggcagccggagaacaactac	2250
aagaccacgcctcccggtggactccgacggctcttcttcttacag	2300
caagctcacctggacaagagcagggtggcagcagggaaacgtttctcat	2350
gctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctc	2400
tccctgtctccggtaaa <u>atgatagat</u> atct	
S P G K *	

【図11】

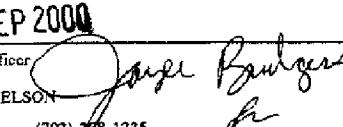
EcoRI		
<u>gaattctgagca</u>		1000
cacaggacacctaccat <u>gggatggagctgttatcatcctcttggtagca</u>		1050
M G W S C I I L F L V A		
acagctacaggtgtccactcc <u>cagtcgtgtt</u> gacgcagccgcctcagt		1100
T A T G V H S <u>Q S V</u> L T Q -		
N- 末端		
ctctgcggccccaggacagaaggtcaccatctctgcactggagcagct		1150
ccaacctcggggcaggttatgtatgttcaactggtaaccggcaacttccaggg		1200
acagcccccaaactcctcatctatgataacaacaatcgccctcaggggt		1250
ccctgaccgattctctggctccaagtctggccctcagcctccctggcca		1300
tctctgggctccaggctgaggatgaggctgattattactgccagtcctat		1350
gacagcagcctgaatggttatgtcttcggaactgggacccagctcaccgt		1400
AvrII		
<u>ccttaggtcagccaaaggctgccccctcggtcactctgttcccgcctcct</u>		1450
ctgaggagcttcaagccaaacaaggccacactgggtgtctcataagtac		1500
ttctacccgggagccgtgacagtggctggaaggcaattagcagccccgt		1550
caaggcgggagtggagaccaccacaccctccaaacaagcaacaacaagt		1600
acgcggccagcagctatctgagcctgacgcctgagcagtggaaagtcccac		1650
agaaggtacagctgccaggtcacgcatgaaggagcaccgtggagaagac		1700
agtggccctacagaatgtt <u>catagtt</u> tagatctacgtatgatcagcct		1750
P T E C S *		

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US00/12694

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A61K 39/395, 39/42; C12Q 1/00, 1/70; G01N 33/53 US CL : 424/130.1, 141.1, 147.1; 435/4, 5, 7.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/130.1, 141.1, 147.1; 435/4, 5, 7.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,814,524 A (BRAMS et al) 22 September 1998, cols. 12- 20.	1, 4, 10-15 -----
Y		2, 3
X	US 5,824,307 A (JOHNSON) 20 October 1998, cols. 4-6.	1, 4, 10-15 -----
Y		2, 3
X	US 5,880,104 A (LI et al) 09 March 1999, cols. 6-10.	1, 4, 10-15 -----
Y		2, 3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'B' earlier document published on or after the international filing date 'C' document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'D' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 16 AUGUST 2000		Date of mailing of the international search report 05 SEP 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer BRETT NELSON  Telephone No. (703) 358-1235

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/13694

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

WEST, DIALOG, MEDLINE

search terms: RSV, respiratory syncytial, monoclonal, antibodies, human, humanized, F protein, diagnostics, passive immunization, therapy, treatment

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 1998)*

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード ⁸ (参考)
C 0 7 K	16/10	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/15		1/19
	1/19		1/21
	1/21	C 1 2 P	21/08
	5/10	G 0 1 N	33/53
C 1 2 P	21/08		D
G 0 1 N	33/53		L
	33/569		B
	33/569	C 1 2 N	33/569
	33/577		Z N A A
	33/577		A

(81) 指定国 E P (A T, B E, C H, C Y,
D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I
T, L U, M C, N L, P T, S E), O A (B F, B J
, C F, C G, C I, C M, G A, G N, G W, M L,
M R, N E, S N, T D, T G), A P (G H, G M, K
E, L S, M W, M Z, S D, S L, S Z, T Z, U G
, Z W), E A (A M, A Z, B Y, K G, K Z, M D,
R U, T J, T M), A E, A L, A U, B A, B B,
B G, B R, C A, C N, C Z, D Z, E E, G E, G
H, G M, H R, H U, I D, I L, I N, I S, J P
, K P, K R, L C, L K, L R, L T, L V, M A,
M G, M K, M N, M X, N O, N Z, P L, R O, S
G, S I, S K, S L, T R, T T, T Z, U A, U S
, U Z, V N, Y U, Z A

(72) 発明者 レイモンド・ダブリュー・スウィート
アメリカ合衆国19004ペンシルベニア州バ
ラ・シンウッド、エッジヒル・ロード108
番

(72) 発明者 ジェラルディーン・ティラー
イギリス、アールジー20・7エヌエヌ、バ
ークシャー、ニューベリー、コンプトン
F ターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA41 CA04 DA02
EA02 EA04 FA02 GA11 HA01
HA11 HA15
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01
DA15
4B065 AA90X AA97Y AB01 BA02
CA25 CA45 CA46
4C085 AA14 BA57 CC07 CC08 DD23
4H045 AA11 AA30 BA10 CA01 DA76
EA31 EA53 FA74